

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA CÁMARA DE MEDICIÓN DE FLUJO
TRANSEPITELIAL DE IONES SODIO EN LA PIEL DE LA RANA COQUÍ
(*ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI*)**

**ALEIDA MABEL ROSERO HERNÁNDEZ
LINA MARIET MAZUERA GUTIERREZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2012**

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA CÁMARA DE MEDICIÓN DE FLUJO
TRANSEPITELIAL DE IONES SODIO EN LA PIEL DE LA RANA COQUÍ
(*ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI*)**

**ALEIDA MABEL ROSERO HERNÁNDEZ
LINA MARIET MAZUERA GUTIERREZ**

Proyecto de investigación para optar al título de Ingeniero Biomédico

**Director
CESAR ROJAS
Ingeniero Electrónico**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2012**

Nota de Aceptación:

**Aprobado por el comité de grado
en cumplimiento de los requisitos
exigidos por la Universidad
Autónoma de Occidente para
optar por el título de Ingeniero
Biomédico.**

JUAN DIEGO PULGARÍN

JURADO

WILFREDO AGREDO

JURADO

Santiago de Cali, 31 de Julio de 2012

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo amor y cariño.

A ti Dios por haberme brindado esta familia tan maravillosa.

A mi papá Edmundo Rosero porque desde pequeña me ha enseñado a ser perseverante y trabajar por un excelente futuro. A mi mamá Luz María Hernández pues gracias a sus consejos y regaños me ayudo a crecer como una gran mujer. A mi hermana Lizbeth Rosero por ser mi compañía y mi mejor amiga. A mi novio Jonathan Escamilla por brindarme su amor y comprensión. A toda mi familia porque a pesar de la distancia sus corazones siempre están conmigo.

Mabel Rosero Hernández.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme fortaleza, sabiduría y decisión.

A mis padres por brindarme una carrera para mi futuro, por todo su amor y sobre todo por creer en mí. Este trabajo es de ustedes, pues a pesar de las dificultades siempre estuvieron apoyándome para que pudiera salir adelante. Con este trabajo quiero devolverles lo que ustedes me han brindado, de todo corazón muchas gracias papá y mamá. Gracias hermanita por estar conmigo en todo momento pues eres tú quien me ha visto reír y llorar. Gracias Jonathan porque me has permitido compartir contigo muchos momentos de alegría y en aquellos momentos de tristeza siempre has estado conmigo. Gracias a mi familia por todo su gran amor y comprensión. Gracias a mis abuelitos Manuel y Beatriz que desde el cielo siempre me regalan sus bendiciones día a día.

A mi compañera de tesis y amiga Lina Mazuera por su gran apoyo y comprensión, gracias Lina porque las dos sufrimos juntas el desarrollo de este trabajo y porque has estado conmigo en las buenas y en las malas.

Gracias a mis profesores, especialmente a nuestro director de tesis Cesar Rojas y nuestro codirector Santiago Castaño pues aprendí mucho de ellos este último año.

Mabel Rosero Hernández.

DEDICATORIA

Primeramente le doy gracias Dios por habernos acompañado desde el inicio hasta el final de este proceso de formación, a mi mamá Ana Virginia Gutierrez por su apoyo incondicional cada uno de mis días, a mi papá Hernan Mazuera y a Maicol Rodriguez por estar siempre presente en los acontecimientos importantes de vida, su apoyo y compresion.

Agradezco infinitamente a mi amiga Mabel Rosero por su apoyo y ayuda incondicional; a nuestros mentores Cesar Rojas y Santiago Castaño por acompañarnos y guiarnos en el desarrollo de este proyecto, con el cual hemos alcanzado tan gran logro.

Lina Mariet Mazuera.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá porque creyó mi, dándome ejemplos dignos de superación, entrega, fortaleza y porque fue mi motor de empuje para seguir a delante cada día. Hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvo impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo llegar hasta el final.

Lina Mariet Mazuera.

CONTENIDO

	Página
GLOSARIO.....	16
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
1 OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2 MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 MEDICIÓN DE POTENCIAL TRANSMEMBRANA	20
2.2 EPITELIO	21
2.2.1 Membrana plasmática..	22
2.2.2 Mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática.	22
2.2.3 Epitelio anfibio.....	24
2.2.4 Circuito eléctrico equivalente de un epitelio.....	25
2.3 RINGER FISIOLÓGICO	27
2.3.1 Solución fisiológica Ringer.	27
2.3.2 Composición química.	27
2.4 ELECTRODOS.....	28
2.4.1 Electrolitos.....	28
2.4.2 Tipos de electrodos.....	28
2.4.3 Electrodo de plata cloruro de plata.....	29
2.5 CÁMARA PARA MEDICIÓN DE FLUJO IÓNICO	31
2.5.1 Tipos de cámaras..	32
2.5.2 Materiales usados generalmente para el diseño de la cámara.....	33
2.6 ELECTRÓNICA DEL PROYECTO	35
2.6.1 Amplificación diferencial..	35
2.6.2 Tensión Offset.	37
2.6.3 Microcontroladores.....	37

2.6.4 Memorias.....	39
2.6.5 LCD.....	41
3 METODOLOGÍA	42
3.1 EXTRACCIÓN DEL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ.....	43
3.1.1 Proceso para extracción del epitelio de la rana coquí.....	44
3.2 PREPARACIÓN DEL RINGER FISIOLÓGICO PARA EL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ.....	46
3.2.1 Pasos para preparación del Ringer..	46
3.3 ELABORACIÓN DE LOS ELECTRODOS PARA EL SISTEMA DE CAPTURA Y GENERACIÓN DE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL	48
3.3.1 Proceso para la elaboración de los electrodos..	48
3.4 ELABORACIÓN DE LA CÁMARA PARA MEDICIÓN DE POTENCIAL.....	52
3.4.1 Proceso para el diseño de la cámara.....	52
3.5 REGISTRO Y CONTROL DE LA SEÑAL.....	56
3.5.1 Amplificación diferencial y compensación de offset.	56
3.5.2 Sumador no inversor..	59
3.6 METODOLOGIA GENERACIÓN, REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LA SEÑAL.....	62
3.6.1 Generación y registro de la señal	62
3.6.2 Almacenamiento de datos..	65
3.7 DISEÑO DE LA FUENTE.....	69
4 IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA.....	71
4.1 MODELO COMPLETO DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE POTENCIAL EN EL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ	71
5 PRUEBAS Y RESULTADOS	75
5.1 ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ.....	75
5.2 PRUEBAS ELÉCTRICAS PARA DETERMINAR LOS CIRCUITOS	78
5.3 DESEMPEÑO DEL SISTEMA.....	78
5.4 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	81
5.5 ESPECIFICACIONES ELÉCTRICAS Y FÍSICAS DEL SISTEMA.	86
6 LIMITACIONES DEL SISTEMA.....	87

7 CONCLUSIONES.....	88
8 RECOMENDACIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS.....	94

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de algunas sustancias electrolíticas.....	27
Tabla 2. Datos para cálculo del espesor del epitelio.	76
Tabla 3. Datos para cálculo del ancho y largo del epitelio.....	77
Tabla 4. Especificaciones del sistema	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama básico del sistema para medición de potencial.....	20
Figura 2. Mecanismos básicos de transporte.	24
Figura 3. Estructura del integumento de los anfibios.	25
Figura 4. Modelo circuito equivalente de un epitelio.....	26
Figura 5. Electrodo de plata cloruro de plata.	30
Figura 6. Cámara original de Ussing y Zerahn.....	31
Figura 7. Cámara de circulación.....	32
Figura 8. Cámara de perfusión.	33
Figura 9. Amplificador operacional.....	35
Figura 10. Amplificador diferencial básico.....	36
Figura 11. Rana coquí.....	44
Figura 12. Instrumentos de microcirugía.....	44
Figura 13. Descerebración de la rana.	45
Figura 14. Extracción del epitelio.....	46
Figura 15. Alambres de plata	48
Figura 16. Limpieza del alambre.....	49
Figura 17. Protección del alambre.....	50
Figura 18. Elaboración del electrodo con el alambre de plata.....	50
Figura 19. Cloruración de los electrodos.....	51
Figura 20. Láminas portaobjetos.....	52
Figura 21. Calibrador.....	53

Figura 22. Piezas de PVC para la fabricación de la cámara.	54
Figura 23. Esquema inicial de la cámara.	54
Figura 24. Esquema final de la cámara.	55
Figura 25. Cámara implementada con material de PVC.	55
Figura 26. Posicionamiento del epitelio en la cámara.	56
Figura 27. Circuito interno del LM 324.	56
Figura 28. Compensación de offset para un amplificador diferencial.	57
Figura 29. Esquemático del circuito amplificador y de compensación de offset.	58
Figura 30. Sumador no inversor.	59
Figura 31. Montaje del circuito sumador no inversor.	60
Figura 32. Esquema de instrumentación realizado en el software Eagle.	61
Figura 33. Diseño en Eagle para la plaqueta de instrumentación.	61
Figura 34. Plaqueta de la etapa de instrumentación.	62
Figura 35. Diagrama de pines.	63
Figura 36. Diagrama de flujo implementado en el microcontrolador PIC.	64
Figura 37. Esquema para generación, registro y almacenamiento de la señal.	67
Figura 38. Diseño en Eagle para la plaqueta de generación, registro y almacenamiento.	68
Figura 39. Plaqueta implementada para generación, registro y almacenamiento.	68
Figura 40. Esquema de la fuente.	69
Figura 41. Diseño en Eagle para la plaqueta de la fuente.	70
Figura 42. Plaqueta de la fuente.	70
Figura 43. Diagrama de bloques del sistema.	71

Figura 44. Simulación del sistema en el software Proteus.	73
Figura 45. Plaquetas del sistema completo.....	74
Figura 46. Representación transitoria del potencial en el tiempo.	80
Figura 47. Cursos temporales con estímulos de a) 10, b) 20, c) 30 y d) 40 mV.	82
Figura 48. Cursos temporales realizados a cinco epitelios con un estímulo de 30 mV.	83
Figura 49. Promedio de los cursos temporales realizados a cinco epitelios.	85

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo A. Características de los circuitos integrados implementados.	94
Anexo B. Software de simulación	100
Anexo C. Software de programación y software para diseño de tarjetas.....	101
Anexo D. Quemador y compilador	102

GLOSARIO

MEMORIA EEPROM: se trata de memorias de sólo lectura, programables y borrables eléctricamente (Electrical Erasable Programmable Read Only Memory). Tanto la programación como el borrado, se realizan eléctricamente desde el grabador y bajo el control programado de un PC.

MOLALIDAD (m): es el número de moles de soluto que contiene un Kg de disolvente.

MOLARIDAD (M): es la concentración molar, es decir es el número de moles de soluto por cada litro de disolución.

RINGER: es una solución buffer cuyo objetivo es mantener las células vivas cuando estas se encuentran fuera de su entorno.

RISC: de las siglas en inglés de, Computadores de Juego de instrucciones Reducido. Es una de las tres orientaciones en cuanto a la arquitectura y funcionalidad de los procesadores actuales.

RESUMEN

Esta tesis fue creada con la finalidad de diseñar e implementar un sistema de medición de potencial transepitelial en la piel de la rana Coquí, la cual es de aproximadamente 2 cm de largo. Para ello se requirió diseñar un sistema con la capacidad de realizar mediciones pequeñas, alrededor del orden de los milivoltios.

En el desarrollo de este proyecto se diseñó la instrumentación suficiente para realizar medición de potenciales que reflejan la capacidad de transporte iónico en epitelio de rana Coquí. Para ello se utilizaron epitelios previamente estabilizados y que luego fueron estimulados, con el fin de hacer las pruebas correspondientes con base en procedimiento definido por Noyes y Rhem [23].

Para poder hacer las pruebas y mediciones, fue necesario elaborar electrodos de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl), y diseñar una cámara adecuada a la morfometría de los epitelios, además de circuitería que permitiera la medición y almacenamiento de dichas pruebas; los datos fueron registrados en una interfaz gráfica realizada en el software Visual C#, luego se extrajeron y se llevaron al software Origin para ser graficados.

Palabras clave: rana coquí, potencial transepitelial, transporte iónico, epitelio, estabilización, estimulación, tensión.

INTRODUCCIÓN

El transporte de sustancias a través de los diferentes epitelios, se realiza por un mecanismo básico a través de una lámina celular, que corresponde a un transporte activo y a un transporte pasivo. Entre las sustancias que se transportan mediante transporte activo están el sodio, el potasio, el calcio, el hidrogeno, el cloruro y otros iones. El mecanismo de transporte activo que tiene un estudio más detallado, es el de la bomba sodio-potasio, que bombea iones sodio hacia fuera a través de la membrana de las células y al mismo tiempo bombea iones potasio desde el exterior hacia el interior.

El transporte de iones de sodio y potasio a través de una membrana produce una diferencia de potencial en el epitelio, que puede cuantificarse con la utilización de un sistema de cámara de Ussing, la cual por medio de un corto circuito, permite determinar el origen de la tensión eléctrica que se genera entre la superficie externa e interna de un grupo de epitelios denominados polarizados o asimétricos. Dichos epitelios no sólo manifiestan una polarización eléctrica sino anatómica, metabólica y funcional.

Para la investigación del transporte de sustancias a través de epitelios por medio del sistema de cámara de Ussing, se utilizan con frecuencia tres tipos de epitelios: axones de calamar gigante, vejiga de sapo y piel de rana. Comúnmente se utiliza el epitelio de rana; pues este se comporta de forma similar que los de humanos tales como los renales, los intestinales y otros.

Actualmente se adelanta una investigación en la ciudad de Cali, con el epitelio de la rana invasora coquí (*Eleutherodactylus johnstonei*) para la cual no está adecuada la cámara de Ussing tradicional debido a que esta no se adapta a las especificaciones requeridas en cuanto al tamaño físico de una muestra, ni a la forma ni al rango de medición de la variable de interés. Al no existir otra alternativa de medición de potencial transmembrana, se propone el diseño e implementación de una cámara que se adecue a la morfometría de la citada rana y permita obtener datos que generen conclusiones válidas dentro de la investigación.

La implementación de la cámara contribuye con el avance científico en el campo de la medicina, farmacología, fisiología y campos afines, así como también permite la realización de diferentes experimentos que promueven la adquisición de conocimiento y experiencia en el campo de la Ingeniería Biomédica en la Universidad Autónoma de Occidente, facilitando así el desarrollo profesional de sus estudiantes.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar e implementar un cámara de medición del flujo de iones sodio a través del epitelio de la piel de la rana coquí (*Eleutherodactylus johnstonei*).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la morfometría de la piel de la rana invasora (*Eleutherodactylus johnstonei*).
- Definir las especificaciones eléctricas y físicas de la cámara de medición.
- Investigar y simular circuitos con componentes que permitan cumplir con las especificaciones eléctricas y físicas del sistema.
- Diseñar e implementar la cámara, de acuerdo con las especificaciones físicas y eléctricas determinadas.
- Diseñar un sistema confiable de medición de corriente acorde a los niveles esperados.
- Adaptación de todo el sistema y realización de pruebas con el fin de validar su buen funcionamiento.

2 MARCO TEÓRICO

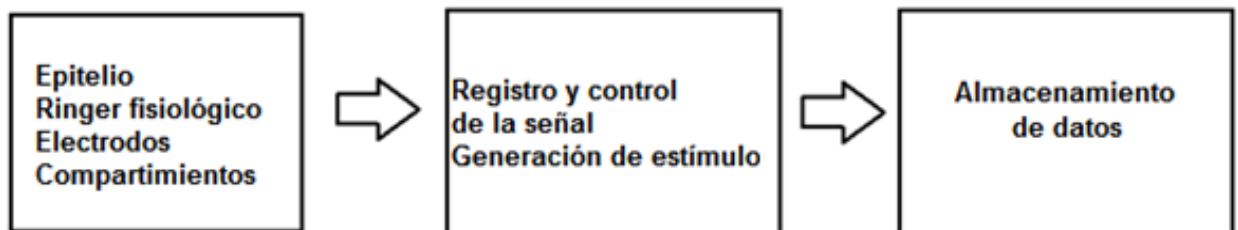
2.1 MEDICIÓN DE POTENCIAL TRANSMEMBRANA

La membrana celular del epitelio está compuesta por distintas clases de canales iónicos los cuales contienen poros acuosos que al abrirse permiten el paso selectivo de iones específicos a través de la membrana; estos iones determinan la corriente total de la membrana. Para medir el potencial en un epitelio aislado, es necesario bloquear el flujo de algunos iones.

En la actualidad existe un sistema que permite registrar el potencial como un indicador de transporte de iones a través de un epitelio; dicho sistema consta de dos compartimientos del mismo tamaño, sin un lado en cada uno, entre los que se coloca un epitelio aislado para separar una solución determinada. Adicionalmente el sistema cuenta con un juego de cuatro electrodos de los cuales dos generan una diferencia de potencial por medio de un potenciómetro y una batería, los otros dos se encargan de realizar la medición por medio de un voltímetro.

El sistema para medición de potencial se constituye como una base de gran importancia para el estudio de la determinación de las propiedades eléctricas de los epitelios en el campo de la electrofisiología. Los principales componentes para la medición del potencial son: dos compartimientos, epitelio, Ringer fisiológico de anfibios, electrodos, instrumentación para adquisición de señal, almacenamiento y registro de datos (Ver figura 1).

Figura 1. Diagrama básico del sistema para medición de potencial.



2.2 EPITELIO

Es uno de los cuatro tejidos básicos del organismo y deriva de las tres capas germinales. Está compuesto por células muy cercanas entre sí, sin sustancia intercelular que las separe. Su nutrición se da gracias a los vasos capilares ubicados en el tejido conectivo subyacente, del cual está separado por una capa extracelular de sostén llamada lámina basal.

Cualquier sustancia que ingresa al organismo pasa a través de las células epiteliales y no entre ellas. En el epitelio, el espacio intracelular es muy escaso y no penetran vasos sanguíneos. Las células se mantienen muy juntas por medio de uniones especiales y, de acuerdo con su actividad, se pueden constituir barreras casi permeables; estos pueden tener una función secretora, transporte de sustancias por su superficie, también pueden movilizar partículas y moco o recibir estímulos sensoriales. Algunas de estas funciones son posibles gracias a la presencia de especializaciones celulares en sus superficies libres o apicales como cilios, flagelos y microvellosidades.

El epitelio está formado por dos capas: Epidermis (parte externa) y dermis (parte interna).

- **Epidermis**, es la capa más externa de la piel. Está formada por tejido epitelial plano estratificado queratinizado. Las células se denominan como queratinocitos. La epidermis está constituida por diversos estratos de células epiteliales.
- **Dermis**, es la capa conjuntiva que está por debajo de la epidermis. Se dispone en forma laminar, es más gruesa y resistente que la epidermis. Es totalmente de tejido conectivo.

2.2.1 Membrana plasmática. Es una delgada capa lipídica de aproximadamente 5 nm de espesor. Todas las células tienen una membrana que separa y protege sus componentes químicos del medio externo.

Para mantener con vida la célula y garantizar su crecimiento, es de vital importancia el ingreso de nutrientes a través de la membrana plasmática y la expulsión de productos de desecho hacia el exterior. La principal característica de esta membrana es que al estar atravesada por canales y bombas muy selectivos, solo permite el paso de sustancias específicas y el egreso de otros compuestos. De esta forma se mantiene estable el medio intracelular, regulando el paso de agua, iones y metabolitos, a la vez que mantiene el potencial electroquímico (haciendo que el medio interno esté cargado negativamente).

La membrana plasmática está compuesta por: bicapa de fosfolípidos y proteínas.

- **Bicapa de fosfolípidos**, Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas. Cada capa de fosfolípidos posee una cabeza hidrofílica, que se caracterizan por presentar afinidad por el agua, mientras que sus dos colas son hidrofóbicas, las cuales son no polares, y se encuentran dirigidas hacia el interior de la membrana.
- **Proteínas**, se encuentran sobre la bicapa lipídica a los dos lados de la membrana, por lo que desempeñan un papel fundamental en la regulación y control de su permeabilidad. Según la función que cumplan dentro de las membranas celulares, se pueden dividir en tres tipos: **proteínas de transporte**, **proteínas receptoras** y **proteínas de reconocimiento**.

2.2.2 Mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática. El transporte de sustancias en las células, desde el citoplasma hacia el exterior celular o viceversa, pueden ser de dos tipos:

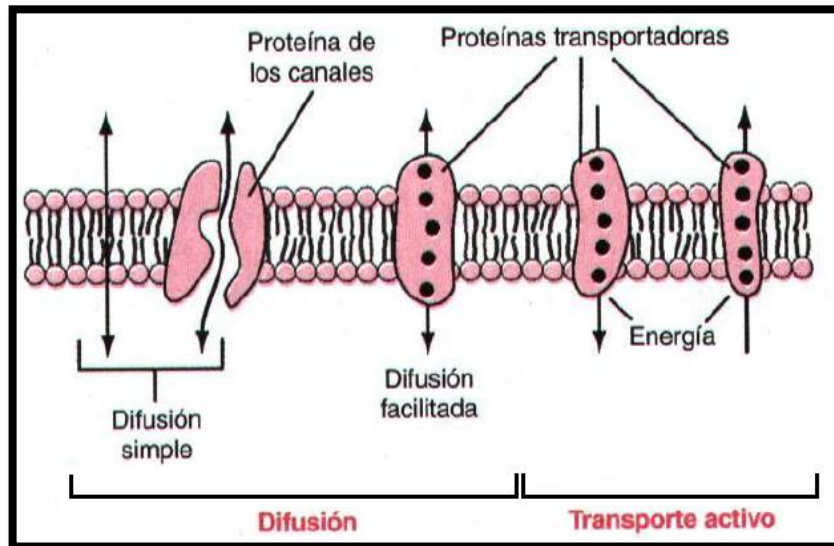
- **Transporte pasivo.** Es uno de los mecanismos fisiológicos de la membrana plasmática el cual no requiere de gasto energético (ATP); dicho desplazamiento se da cuando las moléculas se mueven a causa de gradientes de concentración, electricidad, presión, o las cargas positivas atraen a las cargas negativas o viceversa, o se mueven de las zonas de más alta presión a las zonas de más baja presión osmótica.

La difusión es un tipo de este transporte y este a su vez se divide en dos, la difusión simple y la difusión facilitada.

- **Difusión simple**, corresponde al paso de moléculas desde la zona más concentrada hacia la zona menos concentrada. La rapidez de la difusión depende del tamaño de las partículas, de su carga eléctrica, de la concentración y de la solubilidad.
- **Difusión facilitada**, también es conocida como difusión mediada por transportadores, esto debido a que ciertos iones como K^+ , Na^+ y Ca^{++} , algunos aminoácidos y monosacáridos no se pueden mover por la capa lipídica por si solos, entonces son movilizados por una proteína transportadora específica la cual los traslada cuando se unen a ella químicamente.
- **Transporte activo**. Se da en contra de un gradiente de concentración eléctrico o químico, o sea las moléculas deben desplazarse de una zona de menor concentración a una zona de mayor concentración, por lo que requiere de gasto energético; esta energía procede directamente de la ruptura de trifosfato de adenosina (ATP). En este tipo de transporte se requiere de una proteína transportadora que entrega energía a la sustancia transportadora para que esta sea movida en contra de un gradiente.
- **Bomba sodio potasio**. Esta bomba es de vital importancia en el metabolismo celular. La bomba de sodio potasio tiene simultáneamente funciones de proteína transportadora y de ATPasa (hidroliza ATP para obtener energía). Por lo menos un tercio de la energía que consume una célula animal se destina para impulsar esta bomba. La concentración de sodio y potasio a los lados de la membrana plasmática es diferente, pues el sodio es 15 veces más concentrado en el lado extracelular que dentro de la célula.

Debido a esto se considera que el sodio es el principal catión extracelular y el potasio el principal catión intracelular.

Figura 2. Mecanismos básicos de transporte.

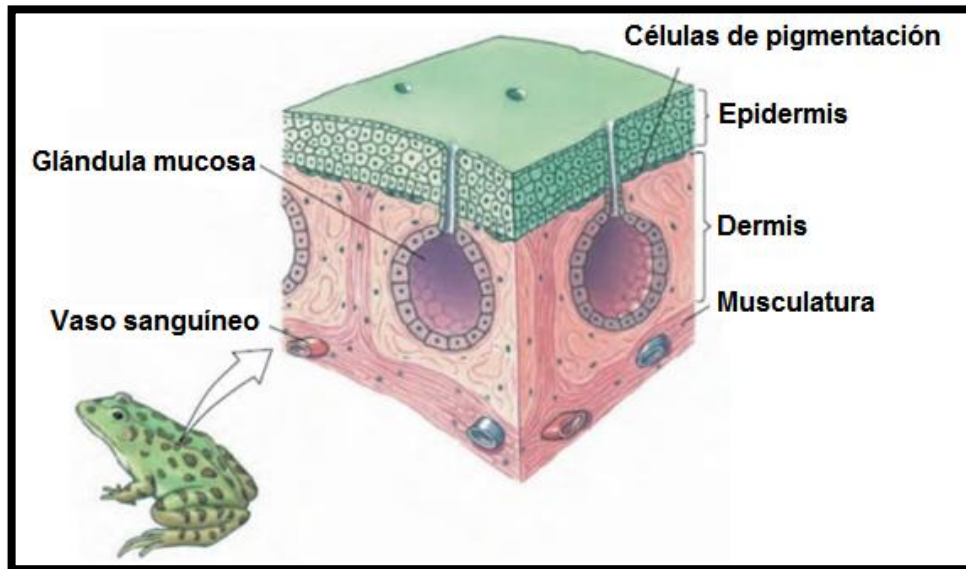


Fuente: [Guyton-Hall]. En: Tratado de Fisiología Médica, Página 46.

2.2.3 Epitelio anfibio. La piel de los anfibios es una estructura intermedia entre la de los animales terrestres y los acuáticos. Esta no sólo cumple la función de protección que la caracteriza, sino que también interviene en el intercambio gaseoso (respiración) complementando o sustituyendo la función de los pulmones. Para realizar esta función, las glándulas mucosas lubrican la piel, para mantenerla húmeda y favorecer el intercambio. El epitelio de los anfibios presenta un potencial desde afuera hacia adentro; para que este proceso se lleve a cabo la permeabilidad al sodio debe ser diferente, es decir, la cara externa debe ser permeable al sodio para permitir su difusión, mientras que la cara interna debe ser poco permeable al ión sodio, así el sodio que se bombee no vuelve a entrar.

Se puede demostrar el transporte de sodio en el epitelio aislado de una rana. En el epitelio de la rana el potencial a través de la piel es generado por transporte activo; las cargas positivas (iones de Na^+ , catión) son recogidas en el exterior de la piel a favor de fuerzas pasivas y transportadas al interior por fuerzas activas. De esta manera la bomba se encarga de separar los iones de sodio de sus aniones (iones Cl^-), el potencial medido corresponde a la separación de estas cargas. Los gradientes eléctricos son formados por la bomba de sodio, pues atrae los iones Cl^- hacia el interior a través de la piel, el flujo neto de sodio crea una diferencia de potencial, haciendo a la piel negativa afuera y positiva adentro.

Figura 3. Estructura del integumento de los anfibios.



Fuente: [Gutiérrez Paul]. En: Zoología de vertebrados, Clase Amphibia. Página 152.

2.2.4 Circuito eléctrico equivalente de un epitelio. Es conveniente considerar a los epitelios como circuitos equivalentes, pues presentan potenciales eléctricos (DV) y debido a que como un ion es una carga, un flujo de iones genera una corriente (I), además de esto los epitelios tienen una resistencia (R).

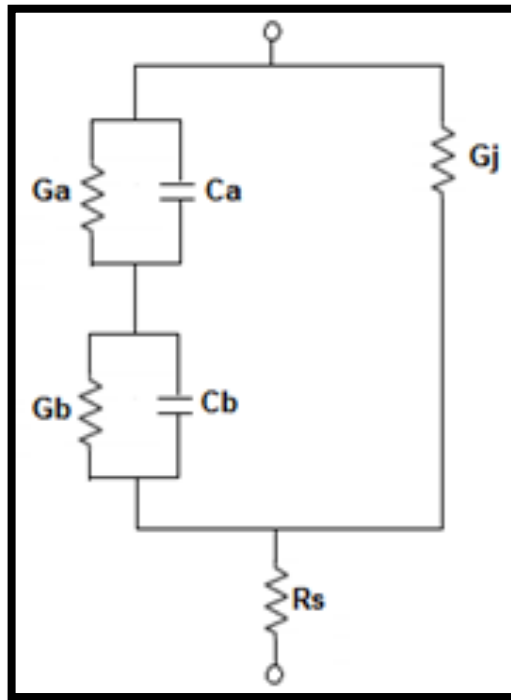
La membrana apical y la membrana basolateral se representan como circuitos paralelos resistencia – condensador (RC), donde G_a y G_b representan las conductancias iónicas respectivas y son proporcionales a las permeabilidades iónicas; C_a y C_b representan las capacidades respectivas de la membrana las cuales son proporcionales al área de la membrana expuesta. La vía pasiva para el paso de iones a través de las uniones estrechas está representada por la conductancia G_j .

Se incluye una pequeña resistencia serie R en la definición del modelo para dar cuenta de la resistencia entre los electrodos de tensión y las superficies epiteliales. La impedancia del modelo agrupado está dada por:

$$Z(j\omega) = \frac{Y_a + Y_b}{Y_a Y_b + G_j(Y_a + Y_b)} \quad (1)$$

Donde: $Y_a = G_a + j\omega C_a$ (admitancia de la membrana apical)
 $Y_b = G_b + j\omega C_b$ (admitancia de la membrana basolateral)

Figura 4. Modelo circuito equivalente de un epitelio.



Fuente: [Sidney Fleischer, Becca Fleischer]. En: [32] Impedance analysis in tight epithelia.

2.3 RINGER FISIOLÓGICO

2.3.1 Solución fisiológica Ringer. Lleva el nombre de su creador el fisiólogo Sydney Ringer, quien en 1882 reveló que pequeñas cantidades de calcio son necesarias en la solución de perfusión para mantener el latido normal del corazón. Ringer perfeccionó la técnica de perfusión demostrando que si se añadían a la solución pequeñas cantidades de potasio a la solución normal de cloruro de sodio, se podían mantener el funcionamiento por largo tiempo de los órganos aislados.

2.3.2 Composición química. Una solución fisiológica Ringer es una solución isotónica e isoiónica de varias sales disueltas en agua, donde la proporción de los iones de Na^+ , K^+ , y Ca^{++} es idéntica a la del plasma sanguíneo, por lo tanto, esta solución garantiza el normal funcionamiento de órganos y tejidos cuando son perfundidos por este suero artificial.

La solución de Ringer normalmente contiene Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), Cloruro de calcio (CaCl_2), y bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Este último es utilizado con el fin de regular el PH de la solución y puede ser reemplazada por Cloruro de magnesio (MgCl_2) ó por Lactato de sodio ($\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$) dependiendo de las aplicaciones y del medio en el que se va a utilizar.

Tabla 1. Características de algunas sustancias electrolíticas.

	Fórmula	Catión	Anión	No	pm
SODIO					
Cloruro	NaCl	Na^+	Cl^-	2	58,5
Lactato	$\text{Na}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)$	Na^+	$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$	2	112
POTASIO					
Cloruro	KCl	K^+	Cl^-	2	74,5
CALCIO					
Cloruro (anhidro)	CaCl_2	Ca^{2+}	2 Cl^-	3	111
MAGNESIO					
Cloruro	MgCl_2	Mg^{2+}	2 Cl^-	3	95

Fuente [R. Montoreano]. Página 41.

2.4 ELECTRODOS

Es un conductor eléctrico en el cual la corriente iónica de una solución se convierte en corriente de electrones en el cable. Estos se hacen de materiales que pueden participar en una reacción reversible con uno de los iones en la solución. El electrodo es utilizado para entrar en contacto con la parte no metálica de un circuito, como un semiconductor, un electrolito, un gas, entre otros. Un electrodo en una celda electroquímica está dado por un electrodo negativo (cátodo) ó un electrodo positivo (ánodo). El electrodo negativo suministra los electrones en una célula química y se produce la reducción, en el electrodo positivo entran los electrones suministrados por el cátodo y se produce la oxidación.

2.4.1 Electrolitos. Surgen debido a una serie de sustancias que son eléctricamente neutras en estado seco, y se pueden dividir en partículas cargadas, o iones, y cuando se disuelven en un soluto adecuado (normalmente agua); estos iones libres se comportan como un medio conductor eléctrico.

Cuando se coloca un electrodo en un electrolito y se aplica una tensión, el electrolito conducirá electricidad. Para que los electrones puedan pasar a través del electrolito debe presentarse una reacción química en el cátodo y en el ánodo; de esta manera se desarrolla una nube de carga negativa en el cátodo y una nube positiva en el ánodo, y así los iones en el electrolito se movilizan para neutralizar las cargas con el fin de que las reacciones puedan continuar.

2.4.2 Tipos de electrodos

- **Electrodos de Gas-Ion.** Están formados por un colector de electrones, el cual es inerte. Dicho colector puede ser grafito o platino y es puesto en contacto con un gas y un ion insoluble.
- **Electrodos Ión Metálico-Metal.** Este electrodo es metálico, es sumergido en una solución la cual contiene un ión metálico. Se utilizan para la cuantificación del catión proveniente del metal con que está construido el electrodo.
- **Electrodo de oxidación-reducción.** Este electrodo posee un colector de metal inerte, por lo general de platino, el cual es sumergido en una solución que tiene dos especies solubles en estado de oxidación.

- **Electrodo Metal-sal insoluble-anión.** Son una barra metálica sumergida en una solución con sal insoluble sólida del metal y aniones de la sal utilizada. Generalmente se utilizan como electrodos de reducción. A este tipo de electrodos se les denomina *electrodos de segunda clase*. En esta clase existen dos tipos de electrodos:
- **Electrodo de Calomel.** Este electrodo está compuesto de mercurio, el cual está cubierto con una capa de cloruro insoluble en equilibrio con una disolución de cloruro de potasio.
- **Electrodo de plata- cloruro de plata.** Es un electrodo de referencia de uso común. Está formado por un hilo de plata sobre el cual se deposita cloruro de plata, generalmente por vía electroquímica en una solución de Cloruro de sodio (NaCl) o Cloruro de potasio (KCl).

2.4.3 Electrodo de plata cloruro de plata. El material de los electrodos de uso más frecuente en electrofisiología es el de plata (Ag), en el cual el alambre está recubierto con un compuesto de plata y cloruro de plata (AgCl). Para este electrodo, los iones cloro (Cl⁻) reaccionan con la plata para producir cloruro de plata (AgCl) más un electrón (e⁻), o un electrón reacciona con cloruro de plata (AgCl) para producir plata (Ag) más cloro (Cl⁻). Así, la corriente transportada por los iones de cloruro en la solución se convierte en electrones de acuerdo con la siguiente reacción reversible:



El potencial eléctrico en uno de estos electrodos es igual al potencial electroquímico estándar de Ag / AgCl más $RT/F \ln (a_{\text{Cl}^-})$, donde:

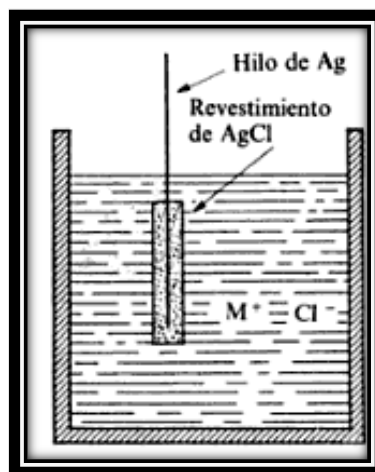
- R es la constante de los gases ($8,314 \text{ VC K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).
- T es la temperatura absoluta en Kelvin.
- F es la constante de Faraday ($9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$).
- a_{Cl^-} es la actividad del Cl⁻ en la solución cerca de la interfase electrodo solución (es decir, la concentración efectiva).

La diferencia de potencial entre un par de estos electrodos debe ser cero si están sumergidos en los compartimientos con igual concentración de cloruro. Estas concentraciones deben mantenerse constantes durante el transcurso del experimento, de lo contrario se puede producir un offset de tensión.

Hay varios aspectos importantes para tener en cuenta acerca de los electrodos de Ag / AgCl:

- Se necesitan dos electrodos, pues la corriente debe fluir en el circuito completo. Si los dos electrodos se encuentran en diferentes concentraciones de Cl^- , se presentará una diferencia en los potenciales de media celda (diferencia de potencial entre la solución y el electrodo) en los dos electrodos, lo que genera una gran diferencia de potencial en los dos cables conectados a los electrodos.
- El electrodo de Ag / AgCl tiene un mejor desempeño en soluciones que contienen iones cloro.
- Si se agota el cloruro de plata (AgCl) en el flujo de corriente, la plata podría entrar en contacto directo con la solución. Los iones de plata desprendidas por el alambre puede envenenar a muchas proteínas.

Figura 5. Electrodo de plata cloruro de plata.

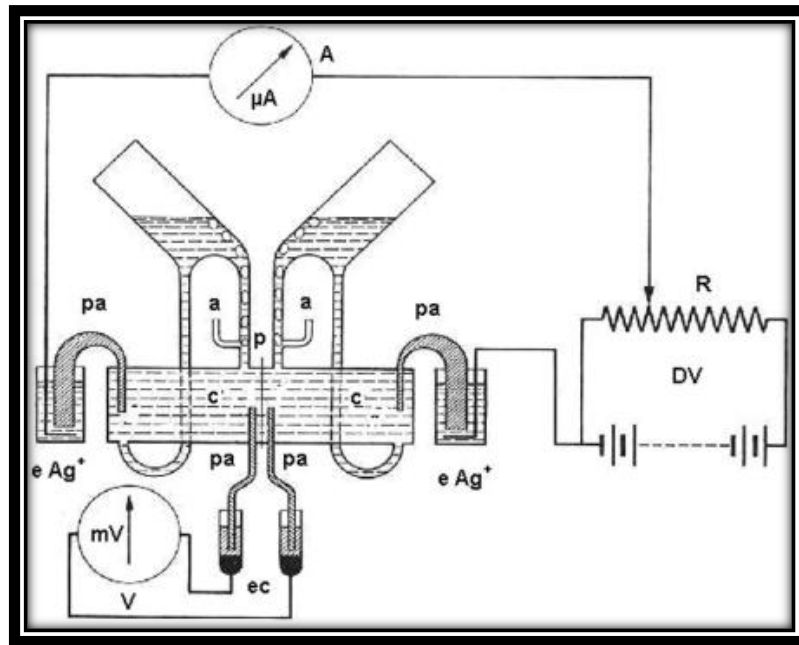


Fuente: [Gilbert W. Castellán]. En: Fisicoquímica, Clases de electrodos. Página 407.

2.5 CÁMARA PARA MEDICIÓN DE FLUJO IÓNICO

Generalmente se le conoce como Cámara de Ussing y sirve para medir el flujo transepitelial de iones, aunque también se ha usado para analizar las propiedades eléctricas del epitelio intestinal.

Figura 6. Cámara original de Ussing y Zerahn.



Fuente: [H, Francisco C.]. Algunos aspectos bioelectroquímicos de la fisiología y la farmacología. Páginas 204-203.

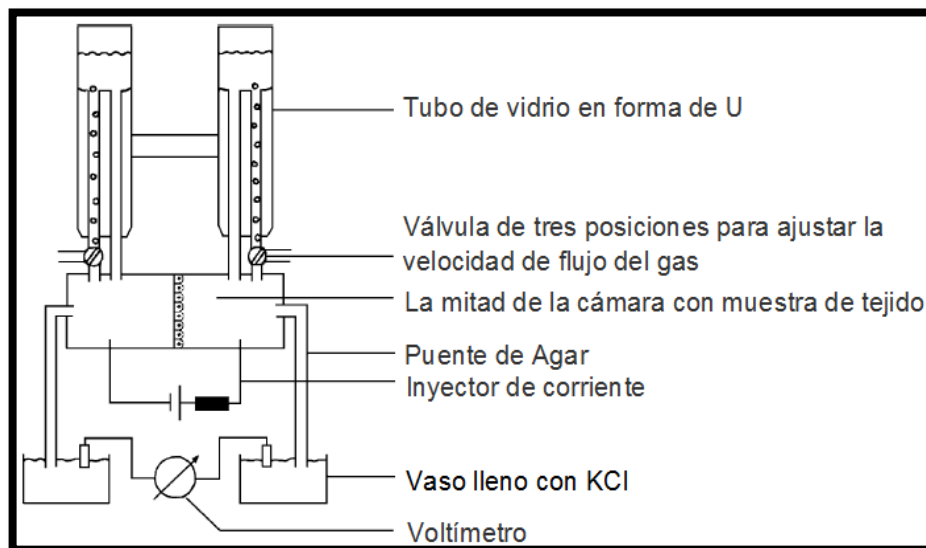
La cámara está constituida por:

- Dos compartimientos, los cuales poseen una cavidad en uno de sus lados, para permitir que las dos caras del epitelio (basolateral y apical) aislado de la rana estén en contacto con las soluciones de ambos compartimientos.
- Orificios para introducir los electrodos de plata cloruro de plata, dos de ellos se encuentran más cerca del epitelio y se encargan de registrar la diferencia de potencial y los dos restantes se encargan de generar el estímulo al epitelio.

2.5.1 Tipos de cámaras. Actualmente existen dos tipos de cámara para medición de potencial transmembrana, una es la cámara de circulación y la otra es la cámara de perfusión continua.

- **La cámara de circulación.** Consiste en un sistema de tubos en forma de U por lo general hechos de vidrio que se llena con la solución experimental. El tubo se puede calentar si es necesario y se llena con gas, ya sea con aire u otros gases como el CO_2 , O_2 o N_2 . El gas sirve para dos propósitos: primero, para oxigenar el líquido contenido y, en segundo lugar, para agitar el líquido para garantizar la convección completa. El tubo en forma de U asegura una presión hidrostática igual en ambos lados de la cámara y, por tanto, evita el daño causado por la flexión de los tejidos.

Figura 7. Cámara de circulación.



Fuente [LI, Hongyu; Sheppard, David N; HUG, Martin]. Transepithelial electrical measurement with the Ussing chamber, En: Journal of cystic fibrosis. Página124.

- **La cámara de perfusión continua.** Posee dos mitades de cámaras, las cuales están diseñadas para minimizar la presión hidrostática y, por tanto, evitar daños graves a los tejidos durante la perfusión. Las soluciones de baño de las dos caras del tejido se entregan a la cámara a través de los embalses montados de 20-50 cm por encima de la cámara a través de tubos de polietileno. Las válvulas se pueden utilizar para regular el caudal, esto depende del diámetro de los tubos y la presión hidrostática. La temperatura se puede ajustar por medio de un sistema de calentamiento de agua.

Figura 8. Cámara de perfusión.



Fuente [Laboratory Handbook]. En: Ussing Chamber analysis of murine native tissues and polarized epithelial cells. Página 3.

2.5.2 Materiales usados generalmente para el diseño de la cámara. Las cámaras para medición de potencial son fabricadas en materiales como el teflón y el polimetacrilato de metilo (conocido comercialmente como lucite o plexiglás).

- **Teflón (PTFE).** El politetrafluoroetileno (PTFE), también conocido comercialmente como teflón, es un polímero de alto peso molecular formada por átomos de flúor y de carbono, los cuales están unidos entre sí por una fuerza muy grande, lo cual lo convierte en inerte, pues el enlace químico que lo conforma es prácticamente imposible de romper.

Ventajas:

- Bajo coeficiente de fricción, inferior a 0,1.
- Comportamiento excelente dentro de un amplio rango de temperaturas (-240 °C hasta 260 °C), sin que se alteren sus propiedades físicas.
- Antiadherente.
- Alta resistencia a la humedad y al paso del tiempo.
- Impermeable y de fácil de limpieza.

Desventajas:

- Costo.
- **Polimetacrilato de metilo.** Es una resina sintética que tiene el aspecto de vidrio, también se lo conoce como vidrio orgánico. El PMMA es un material acrílico, que procede del acetileno mediante formación de acrilato de metilo y polimerización de este último. Se le conoce comercialmente como vidrio acrílico, plexiglás y lucite. El PMMA tiene características ópticas y aplicaciones similares o comparables al vidrio, es muy transparente pero no es frágil y por tanto no se rompe tan fácilmente. Es bastante estable.

Ventajas:

- Es un plástico duro, resistente, transparente.
- Resistente a la ruptura, al desgarre y al envejecimiento .
- Presenta buena resistencia mecánica y estabilidad.

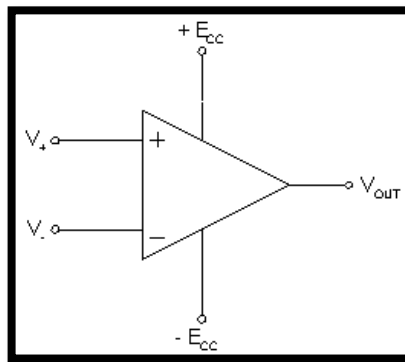
Desventajas:

- Costo elevado.
- Fácil de rallar con cualquier instrumento.

2.6 ELECTRÓNICA DEL PROYECTO

2.6.1 Amplificación diferencial. El amplificador es un dispositivo de dos puertos que recibe una señal la cual se aplica desde una fuente externa (entrada), y genera una señal de salida. Así, se obtiene que $salida = ganancia \times entrada$, en donde la ganancia es una constante de proporcionalidad. Un dispositivo que cumpla con esta definición, toma el nombre de amplificador lineal.

Figura 9. Amplificador operacional.



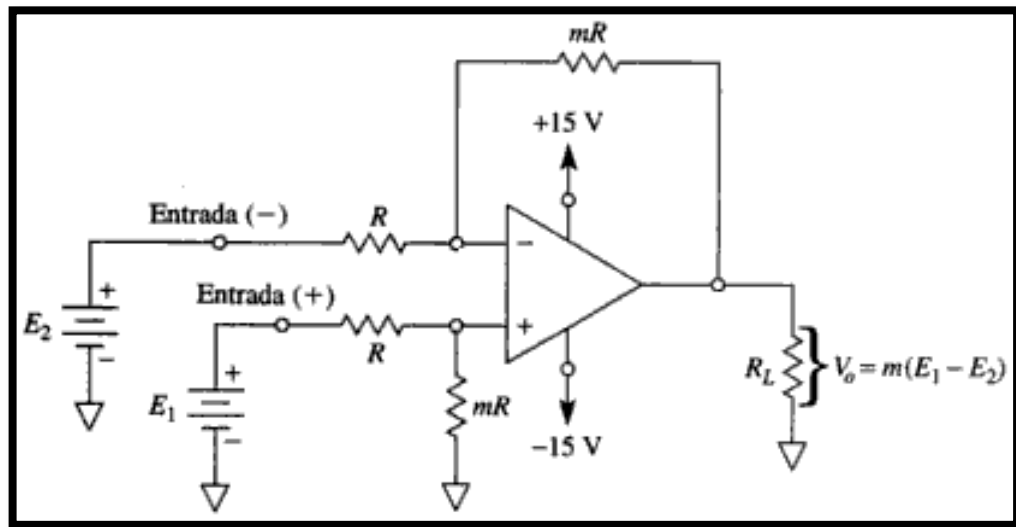
Fuente [C.Robert, D. Frederick]. En: Amplificadores operacionales y circuitos integrados lineales.

Los amplificadores que se usan con mayor frecuencia en instrumentación biomédica, son los de tipo diferencial. Este tipo de amplificadores poseen tres terminales de entrada de las cuales, una está situada en el potencial de referencia y las otras dos son terminales a través de las cuales fluye la tensión, identificadas como entrada (-) y entrada (+). Este tipo de amplificador se emplea cuando es necesario medir la diferencia de tensión entre dos puntos.

El amplificador diferencial es un dispositivo que tiene la capacidad de rechazar las señales de interferencia que vienen junto con la señal bioeléctrica útil las cuales son captadas por los electrodos. Asimismo, tiene una buena estabilidad y versatilidad. La alta estabilidad es dada gracias a que es insensible a los cambios de temperatura. Es versátil debido a que puede ser adaptado en diferentes aplicaciones.

El diseño de un buen amplificador diferencial implica el uso de cuatro resistencias y un amplificador operacional; los valores de las resistencias se consideran proporcionales, con el fin de establecer relaciones entre los componentes.

Figura 10. Amplificador diferencial básico.



Fuente [C.Robert, D. Frederick]. En: Amplificadores operacionales y circuitos integrados lineales. Página 216.

Cuando E_1 y E_2 están en las entradas (+) y (-), respectivamente, V_0 vale $mE_1 - mE_2$, o:

$$V_0 = mE_1 - mE_2 = m(E_1 - E_2) \quad . \quad (3)$$

Esta ecuación muestra que la tensión de salida del amplificador diferencial básico, V_0 , es proporcional a la diferencia de la tensión aplicado a las entradas (+) y (-). Al multiplicador m se le denomina ganancia diferencial y está definido por la relación que existe entre las resistencias. El cálculo de la ganancia diferencial se realiza con la siguiente ecuación:

$$m = \frac{mR}{R} \quad . \quad (4)$$

2.6.2 Tensión Offset. En los amplificadores operacionales, lo ideal es que la señal que entra sea la misma o en proporción a la señal que sale, pero casi siempre hay un desfase o un desvío de tensión, el cual puede variar en el orden de los microvoltios a milivoltios; este desvío se conoce también como tensión de offset. Esta está presente en la salida del amplificador aún cuando sus entradas son cero. Este desvío es originado por pequeños desbalances que se producen en el interior del amplificador operacional. Para lograr que dicho desvio sea cero, se deben realizar circuitos de compensación del offset. La siguiente ecuación permite realizar el cálculo de la tensión de offset:

$$V_0 = \text{error de voltaje debido a } V_{os}, \text{ entonces } V_0 = V_{os} \left(1 + \frac{R_2}{R_1} \right) . \quad (5)$$

La tensión offset de entrada sólo es intervenido por la ganancia de la etapa, y esta es una característica funcional que está establecida en las especificaciones del diseño. Basicamente hay dos formas para lograr atenuar la tensión offset: una es mediante la selección de un adecuado amplificador operacional y la otra mediante la compensación de este por medio de un circuito externo o interno.

2.6.3 Microcontroladores. Inicialmente los controladores se fabricaban solo con componentes de lógica discreta; posteriormente se implementaron los microprocesadores, los cuales contenían chips de memoria y puertos E/S sobre una tarjeta de circuito impreso. Hoy en día el microcontrolador se constituye como un circuito integrado que incorpora la mayor parte de los elementos que configuran un controlador. Su reducido tamaño minimiza el número de componentes y el costo.

Un microcontrolador presenta los siguientes componentes:

- Procesador o UCP (Unidad Central de Proceso).
- Memoria RAM para guardar los datos.
- Memoria para el programa tipo ROM, PROM, EPROM.
- Líneas de E/S para la comunicación con el exterior.
- Diferentes módulos para el control de periféricos (Temporizadores, Puertas serie y paralelo, CAD, CAD, etc).
- Generador de impulsos de reloj que sincronizan el funcionamiento de todo el sistema.

Por lo tanto el microcontrolador es un dispositivo autónomo, que no requiere de una serie de circuitos integrados de soporte para su funcionamiento en comparación a los microprocesadores convencionales. Se ofrece varias ventajas sobre los sistemas convencionales multichip. Existen las ventajas de costo espacio, pues se evita lo costos adicionales de circuitos integrados y se eliminan los conectores que apoyan los sistemas multichip Las otras ventajas hacen referencia al bajo costo del mantenimiento y a la disminución de la densidad del montaje, lo cual es relevante en los diferentes equipos.

- **PIC.** Se conocen como PIC (de las siglas Peripheral Interface Controller) a la familia de microcontroladores cuyo procesador es de tipo RISC fabricados por Microchip Technology Inc. Inicialmente estos microcontroladores fueron diseñados para solventar el problema que presentaba el microprocesador de 16 bits CP1600 el cual no manejaba eficazmente las Entradas y Salidas E/S.

La arquitectura del PIC comercializado en 1975, era básicamente la misma que la de los actuales modelos PIC16C5X, la cual es una familia de microcontroladores de gama baja. En aquel momento se fabricaba con tecnología NMOS, sólo se ofrecía con memoria ROM y con un pequeño pero robusto microcódigo. Sin embargo, el PIC, se mejoró con la implementación de una memoria EPROM, para obtener un controlador de canal programable.

Existen tres gamas de PIC, las cuales están diseñadas para cumplir con las necesidades del usuario.

- Gama baja, los PICs de esta gama vienen con una memoria de programa que puede contener 512, 1k y 2k palabras de 12 bits, y puede ser de tipo ROM o EPROM. Sólo disponen de un temporizador (TMR0), un repertorio de 33 instrucciones y tiene entre 12 y 20 pines para soportar las E/S.
- Gama media, los PICs de esta gama admiten interrupciones, poseen comparadores de magnitudes analógicas, convertidores A/D, puertos serie y diversos temporizadores. Existen modelos de esta gama que poseen una memoria de instrucciones tipo EEPROM.
- Gama alta, los PICs de esta gama responden a microcontroladores de arquitectura abierta que se pueden expandir en el exterior al poder sacar los buses de datos, direcciones y control. Permiten ampliar la configuración interna

del PIC añadiendo nuevos dispositivos de memoria y de E/S externas; por esta razón estos componentes tienen entre 40 y 44 pines. Admiten interrupciones, tienen puerto serie, varios temporizadores y mayor capacidad de memoria, que alcanza 8k de palabras en la memoria de instrucciones y 454 bytes en la memoria de datos.

Ventajas:

- Bajo costo.
- La arquitectura del procesador sigue el modelo Harvard.
- Procesador RISC.
- La arquitectura está basada en un “banco de registro”.
- Tienen puertos E/S.
- El formato de todas las instrucciones tiene la misma longitud, esta característica es muy favorable en la optimización de la memoria de instrucciones.
- Existen tres gamas diseñadas para las necesidades del usuario.

2.6.4 Memorias. Una memoria es una pieza muy importante en las máquinas que estén basadas en procesadores; pues es un dispositivo semiconductor que permite almacenar o guardar información codificada en números binarios. Las memorias poseen un conjunto de posiciones o direcciones donde son almacenados números binarios de un determinado tamaño, dependiendo de esta característica se pueden denominar como: Bits, Nibbles, Bytes o Words.

Una memoria posee las siguientes entradas y salidas:

- Una entrada, la cual indica la posición de la memoria: dirección o address.
- Una entrada-salida, la cual escribe o lee el número o dato almacenado: dato o data.
- Una señal, la cual permite indicar que se está efectuando la lectura: read.
- Una señal que indica que se está realizando escritura: write.

En general se pueden definir algunos parametros para todas las memorias:

- **Unidad de almacenamiento:** bit.
- **Tiempo de acceso (t_a):** es el tiempo que tarda la memoria en leer o escribir una palabra en la memoria. La velocidad de acceso $ba=1/t_a$ se mide en palabras/segundo.
- **Capacidad de almacenamiento:** cantidad de bits que puede almacenarse. Si la unidad de almacenamiento es el bit, ya que muchas veces se usa el byte. Pero también se encuentran capacidades en Kb (1Kb = 1024 bytes), en Mb (1Mb = 1024 Kb), en Gb (1Gb = 1024 Mb), etc.

Se pueden considerar con un sistema digital mixto, el cual es capaz de almacenar información binaria. Dichas memorias se clasifican en:

- **Memorias de acceso aleatorio (RAM):** se caracterizan por ser memorias de lectura y escritura, las cuales contienen un conjunto de variables de dirección que permite seleccionar cualquier dirección de memoria de forma directa e independiente de la posición en la que se encuentre. Son memorias volátiles, lo cual indica que se pierde la información cuando no hay energía y se clasifican en dos categorías, la RAM estática (SRAM) y la RAM dinámica (DRAM).
- **Memorias de solo lectura (ROM):** se caracterizan por ser memorias de lectura que contienen celdas de memoria no volátiles, esto significa que la información que ha sido almacenada se conserva sin necesidad de energía.

Se subdividen en:

- ROM, se graba una vez por el fabricante.
- PROM, se graba una vez por el usuario.
- EPROM, se graba varias veces por el usuario, el borrado se realiza con luz ultravioleta.
- EEPROM, se graba varias veces por el usuario, el borrado se realiza eléctricamente posición a posición.
- FLASH, se graba varias veces por el usuario, el borrado se realiza eléctricamente de una sola vez.

2.6.5 LCD. (Liquid Cristal Display) o pantallas de cristal liquido son pantallas pasivas que no radian luz. En dichas pantallas hay una capa de cristal liquido apaximada de 10 um de grueso, la cual esta situada entre dos placas de vidrio. Una de las placas de vidrio posee la forma de un electrodo de la imagen deseada, como por ejemplo una letra o un número, y la otra placa se encuentra como electrodo común. Las dos placas de vidrio tienen electrodos a los que se les aplica una tensión. Las pantallas de cristal liquido trabajan con tensión alterna, ya que la tensión continua daña los cristales líquidos.

Los LCD se basan en cuatro principios:

- La luz se puede polarizar.
- Los cristales líquidos pueden transmitir y cambiar la luz polarizada.
- La estructura de un cristal líquido puede ser cambiada por corriente eléctrica.
- Hay sustancias transparentes que pueden conducir electricidad.

3 METODOLOGÍA

Inicialmente se había propuesto realizar medición de flujo de iones sodio por medio de la corriente registrada en el epitelio; pero en el transcurso del desarrollo del proyecto se adoptó una nueva metodología donde se realizó la medición del potencial transmembrana en el epitelio de la rana coquí, y para ello fue necesario tener en cuenta el tipo de experimentos que se deberían realizar con el instrumento implementado.

Por lo general para la evaluación de fármacos, toxinas y el transporte fisiológico (normal) de iones, se emplean tiempos de registros que van desde segundos hasta minutos. Para este tipo de experimentos, se puede medir como control el curso temporal (registro transitorio) del potencial transepitelial sin un estímulo diferente al potencial de cortocircuito (0 mV). Luego se aplica un estímulo (aplicación de un fármaco, un metabolito, una toxina o un potencial diferente al de cortocircuito) para evaluar si se presentan alteraciones del curso temporal del cambio de voltaje (el cambio de voltaje se logra por el transporte activo transepitelial de iones) o mediante la medición directa al registrar y medir la aparición de corrientes de iones que no correspondiera al curso temporal fisiológico del epitelio. Cualquiera de estas dos variables daría cuenta de cómo se modifica el transporte de iones en el epitelio y el efecto sería verificable al observar diferencias en los trazos de los cursos temporales.

Tres ejemplos de trabajos como los que se quieren implementar con este tipo de instrumento pueden observarse en los trabajos de Castillo et al., (1997) [7]; los de Del Razo et al., 2001 [10]; o los de Kawago et al., 2008 [19], que se explican a continuación:

Castillo et al., (1997). Estudiaron la respuesta de la noradrenalina (NA) en pieles aisladas de dos tipos de anfibios: una rana semiacuática (*Leptodactylus chaquensis*) y un sapo terrestre (*Bufo menarum*); esto con el fin de determinar los mecanismos de transporte epitelial ante el suministro de este fármaco. Para realizar esta investigación los autores registraron el comportamiento de la corriente de corto circuito y la conductancia transepitelial ante el suministro de este fármaco durante 60 minutos.

Del Razo et al., (2001). Investigaron el funcionamiento de la enzima ATPasa de Na y K en el transporte de sodio transepitelial al ser alterado por el suministro del fármaco aloxano, con el fin de obtener información sobre los mecanismos implicados en la disminución del transporte de sodio provocada por dicho fármaco. Se midieron los cambios en la corriente de cortocircuito y en el contenido intracelular de sodio y potasio, bajo condiciones de actividad de la enzima estimulada al máximo. El tiempo de respuesta de la enzima ATPasa de Na, K al inducir el aloxano está en el orden de minutos.

Kawago et al., (2008). Midieron los efectos de arginina vasotocina (AVT) y el efecto de los antagonistas del receptor de la vasopresina para medir como se alteraba el transporte de Na y de Cl en pieles aisladas de las ranas *Hyla japonica* y *Rana nigromaculata*. Para hacer este trabajo los autores midieron como cambiaba el potencial transepitelial al añadir los antagonistas y se observaron cambios dramáticos del potencial transepitelial durante los 50 minutos en los que se realizó la prueba.

3.1 EXTRACCIÓN DEL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ

Inicialmente se planeó pedir permisos de ética en experimentación animal y los permisos ambientales de la ciudad de Cali (sitio de captura de la rana invasora *E. johnstonei*). Sin embargo el trámite se demoró y extendió más allá del tiempo en que se tenía planteada la realización de los experimentos de este trabajo, por lo que los tejidos dermo-epiteliales de la rana *E. Johnstonei* empleados en este proyecto fueron donados por Jenny Juliana Banguero, cuya tesis de pregrado en Biología (Universidad del Valle) está en curso y que cuenta con los soportes de la Universidad en la que ella cursa su programa. De esta forma se aprovecharon los tejidos sobrantes (frescos) de los experimentos de la estudiante Banguero.

El estado del proceso de obtención de permisos para captura y experimentación está en preaprobación por parte del comité de ética en experimentación animal de la fundación CIDEIM en un proyecto dirigido por el profesor Santiago Castaño (Facultad de Ciencias Básicas Médicas de la Universidad Icesi) y cuyo título es: Establecimiento y validación del biomodelo experimental *Eleutherodactylus johnstonei*, para investigaciones fisiológicas y farmacológicas en tejidos excitables. La rana Coquí (*Eleutherodactylus johnstonei*), es originaria del norte de las Antillas Menores, son extremadamente adaptable por lo que se ha convertido en una de las ranas con la más amplia distribución en las Américas.

Figura 11. Rana coquí.



Fuente [Victor Valley College]. Biology. En:
<http://www.vvc.edu/academic/biology/hinrich/RESEARCH%20PHOTOS.htm>

3.1.1 Proceso para extracción del epitelio de la rana coquí. Para realizar la extracción del epitelio de la rana, fue necesario utilizar instrumentos de microcirugía como: punzón, pinza, y tijeras para hacer la disección de forma adecuada y realizar una buena extracción.

Figura 12. Instrumentos de microcirugía.



- Captura de la rana: la captura de las ranas se realizó en viveros de la ciudad de Cali, dichas ranas se encuentran con facilidad en las zonas más húmedas de estos lugares. Una vez capturadas las ranas fueron llevadas a un acuario; el cual simulaba su ambiente natural; se tuvieron ahí hasta que fueron llevadas al laboratorio para realizar la extracción del epitelio.
- Descerebración de la rana: se hizo con el fin de producir inactividad funcional, evitando que la rana salte o se mueva mientras se hace la extracción; dicha descerebración se realizó colocando la rana sobre una superficie plana y firme, luego con una mano se sujetó la cabeza y la cola y se hace presión hacia abajo, disminuyendo así el largo de la rana; una vez se tuvo la rana en dicha posición se trazó una línea imaginaria en el eje del encéfalo, el cual sería el equivalente a la línea vertebral en los humanos, y justo ahí se enterró el punzón.

Figura 13. Descerebración de la rana.



- Extracción de la piel: una vez descerebrada la rana, se prosiguió a realizar la extracción de la piel, para lo cual se utilizaron una pinza y una tijera de micro cirugía. La extracción se inició pinzando la piel por la cabeza de rana y se hizo una pequeña incisión, por donde se siguió cortando hasta bordear toda la parte superior de ella.

Figura 14. Extracción del epitelio.



3.2 PREPARACIÓN DEL RINGER FISIOLÓGICO PARA EL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ

3.2.1 Pasos para preparación del Ringer. Fue necesario conocer los pesos atómicos de cada solvente para realizar el cálculo correspondiente para obtener la solución Ringer.

Pesos atómicos:

Na = 22,9898 g

Cl = 35,453 g

Ca = 40,078 g

K = 39,0983 g

Mg = 24,305 g

- En el siguiente paso se pasó las concentraciones de los solutos que se encontraron en milimoles a moles, para el *NaCl* 135 mM, se hizo de la siguiente forma.

$$135 \text{ mM} * \frac{1 \text{ M}}{1000 \text{ mM}} = 0,135 \text{ M}$$

- Se hallaron los moles del soluto, en este punto se debía conocer el volumen de la solución, para este caso, se va preparar 1 L de Ringer.

$$\text{Moles del soluto: } (0,135 \text{ M}) (1 \text{ L}) = 0,135 \text{ M.L}$$

- Luego se encontró el peso del soluto NaCl , para lograr esto se sumaron los pesos atómicos de cada soluto y también la masa. Esta finalmente es la cantidad de soluto que se agregó al disolvente para garantizar NaCl 135 mM.

$$\text{NaCl: } (22,9898) + (35,453) = 58,4428 \text{ g}$$

$$\text{Masa : } 0,135 \text{ Moles.L} * \frac{58,4428 \text{ g}}{1 \text{ Mol}} = 7,88 \text{ g.L NaCl}$$

Se realizó cada uno de estos pasos anteriores para cada soluto que contiene la solución de Ringer de anfibio.

Las masas de los solutos restantes son los siguientes:

Para KCl 5mM, se necesitan 0,3727 g.L KCl

Para CaCl_2 2mM, se necesitan 0,2219 g.L CaCl_2

Para MgCl_2 1mM, se necesitan 0,0952 g.L MgCl_2

Cada una de estas cantidades de soluto se disolvió en un 70% de disolvente, que para este caso fue agua; como la preparación de la solución de Ringer fue de un litro, los solutos se disolvieron en 700 ml de agua, y estos agregaron en orden descendente, es decir, al agua primero se le agregó los 7,88 g.L NaCl , después 0,3727 g.L KCl y así hasta agregar el de menor cantidad, que para este caso fueron 0,0952 g.L MgCl_2 y se debió agitar la solución. Una vez disueltos todos los solutos, se agregaron los 300 ml restantes para así completar el litro de solución Ringer.

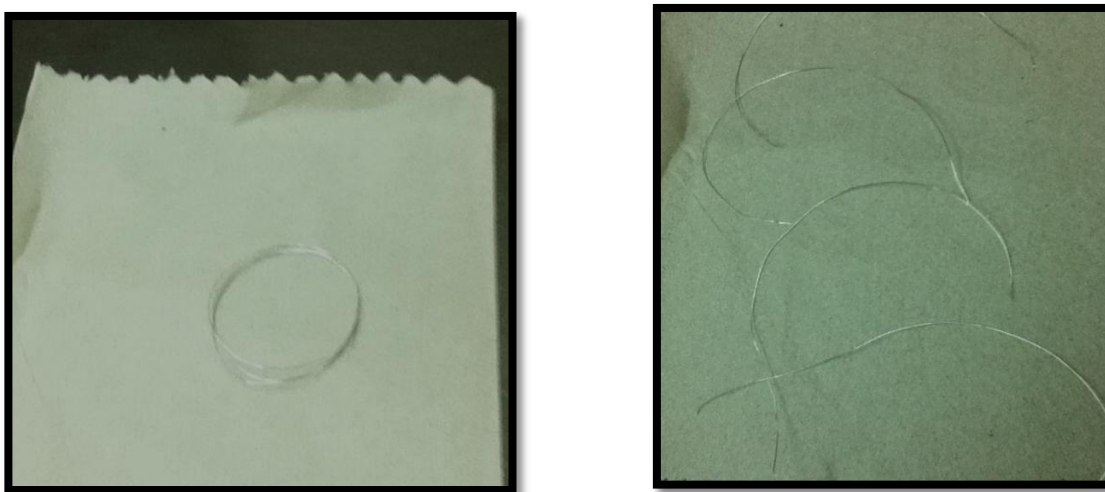
Una vez se obtuvieron los 1000 ml, se debe medir el PH, el cual debe ser de 6.8; si este está muy alto se usa ácido clorhídrico (HCl) para bajarlo, y si está bajo se usa hidróxido de sodio (NaOH) para subirlo.

3.3 ELABORACIÓN DE LOS ELECTRODOS PARA EL SISTEMA DE CAPTURA Y GENERACIÓN DE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL

Para la elaboración de los electrodos se ha tenido en cuenta las características dadas de los electrodos de plata cloruro de plata. (Ver sección 2.4.3)

3.3.1 Proceso para la elaboración de los electrodos. Para la elaboración de los electrodos se necesitaron cuatro alambres de plata de 25 cm de largo cada uno; dos de ellos se ubicaron en los orificios de la cámara que están más cercanos al epitelio, pues estos electrodos se encargaron de medir la diferencia de potencial generada en el epitelio extraído de la rana. Los otros dos electrodos se ubicaron en los dos orificios del extremo de la cámara, los cuales se encargaron de generar el estímulo al epitelio.

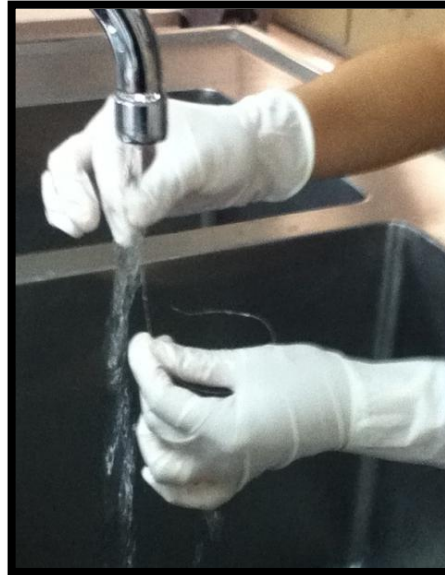
Figura 15. Alambres de plata



Para llevar a cabo el procedimiento para el recubrimiento del alambre de plata con cloruro se tuvieron en cuenta varias etapas. Inicialmente la persona encargada de la elaboración de los electrodos debió usar guantes de látex, una vez puesto los guantes se lavó y secó bien las manos, esto con el fin de remover la grasa que estos puedan tener, ya que esto afectaría la superficie del alambre.

Se lavo y seco muy bien cada alambre, esto con el fin de remover las partículas de polvo que podían encontrarse en él.

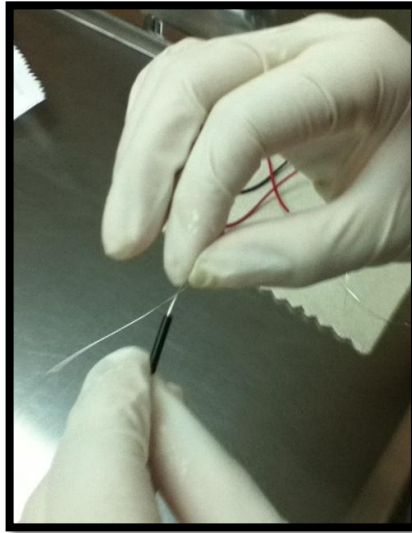
Figura 16. Limpieza del alambre.



Seguido a esto se lijó el alambre con una lija muy fina, pues de lo contrario una lija muy gruesa causaría un gran daño al alambre ya que este era muy delgado. Esto se realizó con el fin de remover el revestimiento de cloro que puede quedar en el alambre después de haber realizado el paso anterior.

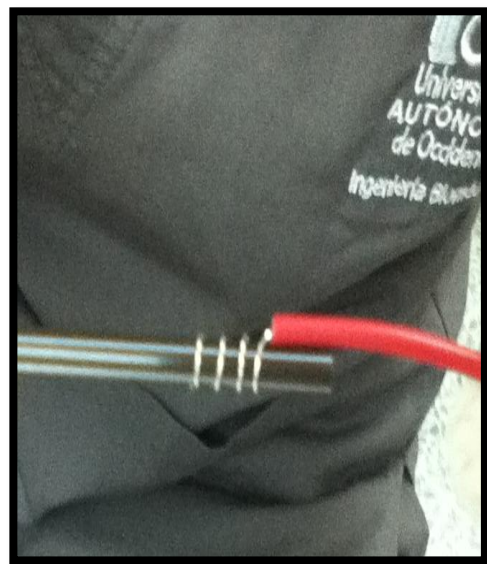
Se introdujo el alambre de plata por un cable aislador para evitar que el alambre quedara expuesto a ruidos que se podían presentar en el medio, así como también para brindarles protección.

Figura 17. Protección del alambre.



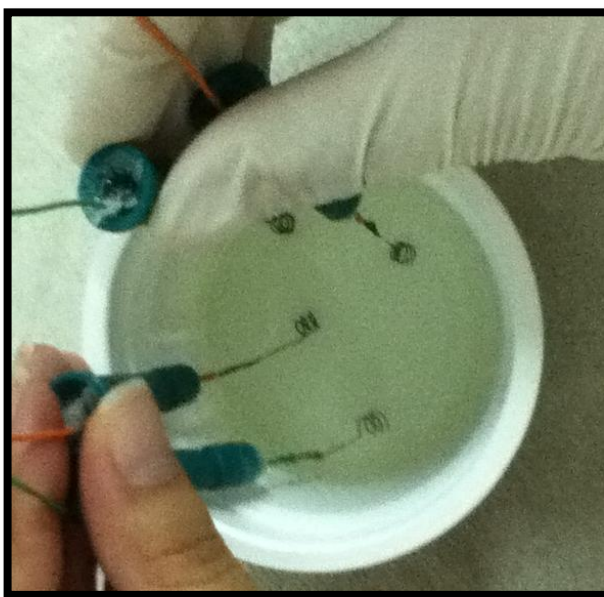
Se dejaron por fuera de este cable aislador 5 cm de largo de alambre de plata, 3 cm se enrollaron con la ayuda de un palillo de madera de 3 mm de diámetro aproximadamente y los otros 2 cm se dejaron por fuera para realizar la conexión con el resto del circuito.

Figura 18. Elaboración del electrodo con el alambre de plata.



Una vez estuvieron listos los cuatro alambres de plata, se colocaron las puntas del extremo superior (las cuales no fueron enrolladas) en corto, esto con el fin de que los electrodos quedaran con la misma cloruración, pues si uno de estos quedaba más clorurado respecto a los demás se podía generar un potencial de contacto (forma una micro pila). En seguida se sumergieron en un recipiente que contenía hipoclorito de sodio (cloro) al 50%, se dejaron en esta solución de 10 a 20 minutos hasta que el recubrimiento de los alambres estuvo uniformemente ennegrecido, de esta manera se obtuvieron los alambres de plata cloruro de plata.

Figura 19. Cloruración de los electrodos.



El recubrimiento del alambre de plata se debe repetir cada vez que se vaya a realizar una nueva prueba, pues con cada experimento se va removiendo el recubrimiento de AgCl en el alambre.

3.4 ELABORACIÓN DE LA CÁMARA PARA MEDICIÓN DE POTENCIAL

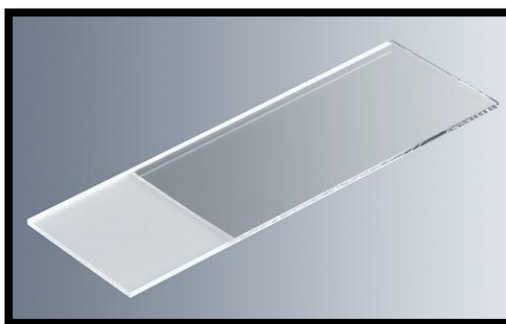
Para la elaboración de la cámara se realizó la selección de los materiales que se usan con mayor frecuencia para aplicaciones fisiológicas, entre los cuales están el lucite y el teflón. En el numeral 2.5.2, se habló de las ventajas y desventajas de estos materiales. La desventaja que estos materiales presentan es su costo, debido a esto se buscó otro material que se acondicionara a las necesidades electroquímicas para la medición; adicionalmente se consideró que el material fuera económico y que se pudiera conseguir fácilmente.

El material seleccionado para la elaboración de la cámara fue el PVC, ya que es económico, se puede conseguir en cualquier ferretería; además por algunas de sus propiedades como la resistividad eléctrica, bajo peso, resistencia, estabilidad e inactividad al estar en contacto con otro cuerpo.

El tipo de cámara que se implementó fue una de perfusión, la cual minimiza la presión hidrostática y evita daños graves a los tejidos durante la perfusión.

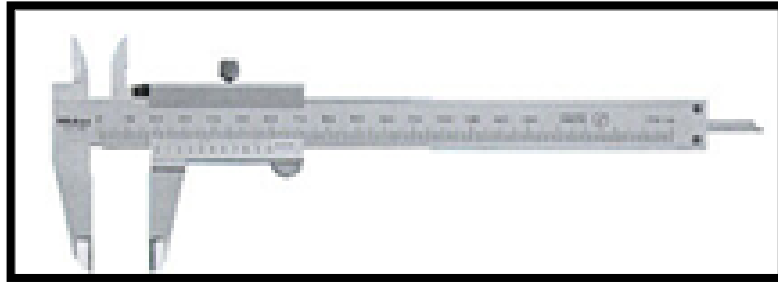
3.4.1 Proceso para el diseño de la cámara. Para realizar el diseño de la cámara, fue necesario conocer la morfometría de la rana Coquí; para ello se utilizaron 15 ranas coquí donadas por la estudiante Banguero, a las cuales se le extrajo la piel y posteriormente se midieron tres variables fundamentales a tener en cuenta para el diseño, dichas variables fueron; espejor, largo y ancho del epitelio. Para medir el espesor del epitelio se utilizó un calibrador y dos porta objeto.

Figura 20. Láminas portaobjetos.



Fuente [MARIENFELD,Laboratorio]. En: <http://www.marienfeld-superior.com/index.php/microscope-slides-328.html>. abril 19 2012

Figura 21. Calibrador.



Fuente [Hernández Rubén]. En: <http://www.pisotones.com/Tri-Wah/cajawah.htm>

Una vez extraído el epitelio, este se colocó en medio de los dos porta objetos; al momento de hacer la medición se tuvo en cuenta que cada porta objeto tenía un espesor de 2 mm y se realizó la medida de la suma de los dos porta objetos y el epitelio. Esta medida se realizó como ya se mencionó anteriormente a 15 epitelios y se hizo un promedio de los valores obtenidos.

Se utilizó una hoja milimetrada, sobre la cual se puso el epitelio y de esta manera se obtuvieron las mediciones del largo y ancho de este. La medición se realizó a 15 epitelios y se halló un promedio de dichas medidas, los datos registrados correspondieron a 1 cm por 1 cm de largo y ancho.

Una vez halladas las medidas de las variables necesarias para el diseño de la cámara, se prosiguió a realizar la selección de los materiales de la cámara, los electrodos y los circuitos necesarios para realizar la captura y registro del flujo iónico.

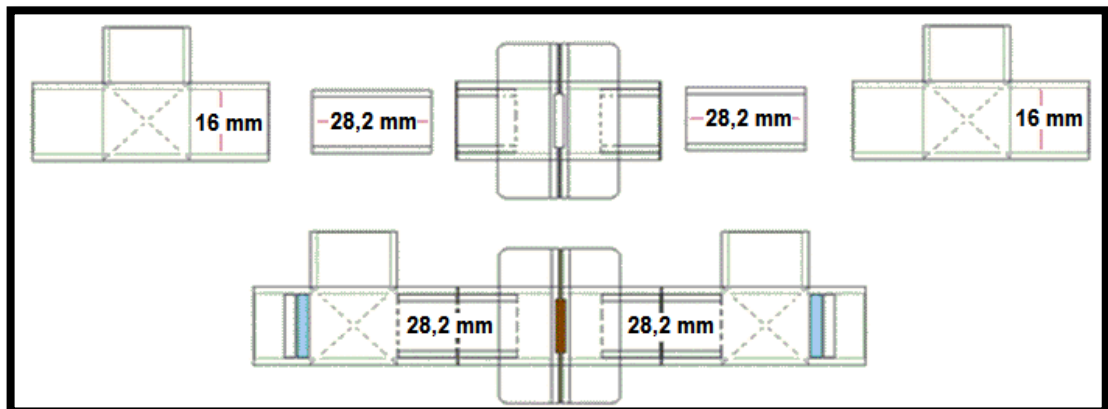
Para la construcción de la cámara se utilizaron T, codos, tubo de media de PVC y una unión universal. Inicialmente el diseño de la cámara fue implementado con dos T, una unión universal y tubo de media de PVC para agua caliente; ya que las dimensiones de todos los elementos y tubos fueron menores que los de agua fría.

Figura 22. Piezas de PVC para la fabricación de la cámara.



Inicialmente el diseño de la cámara constaba de dos T, una unión universal y dos pedazos de tubo 28.2 mm de media de PVC. La función de la unión universal es de contener o sujetar el epitelio y las T son utilizadas para introducir los electrodos.

Figura 23. Esquema inicial de la cámara.



Dicho diseño finalmente no fue implementado, ya que los electros de medición y los de generación de estimulación eran introducidos por los dos orificios de las T, generando dificultades en el momento de la medición. Finalmente se rediseño la cámara, donde se utilizaron cuatro T, dos codos, una unión universal, y pedazos de 28,2 mm de tubo de PVC.

Figura 24. Esquema final de la cámara.

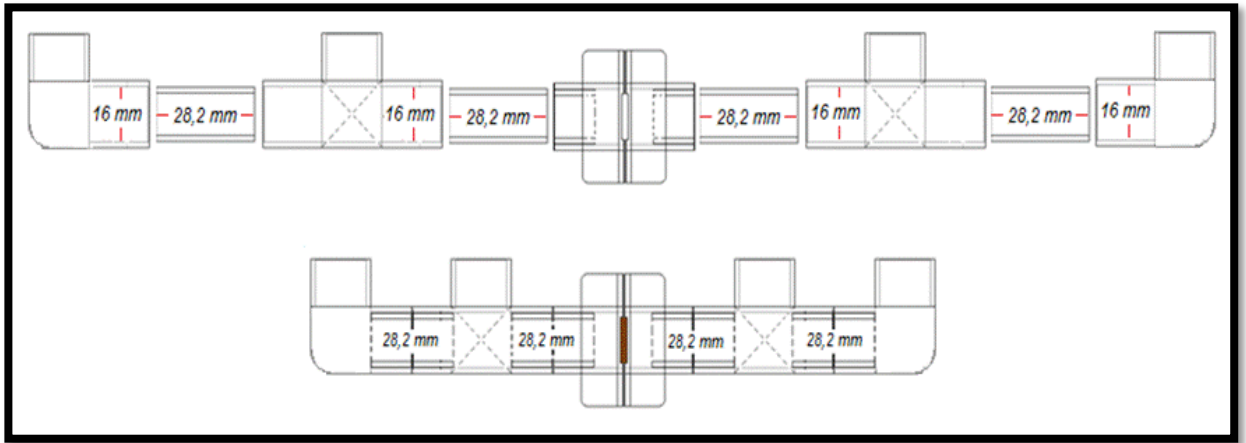


Figura 25. Cámara implementada con material de PVC.



En este diseño se utilizaron cuatro T, una para introducir cada electrodo; y al igual que en el diseño anterior una unión universal, donde hay dos empaques de caucho, los cuales se encargan de tener sujetado el epitelio de la rana; una vez ubicado el epitelio en medio de estos empaques se colocó este conjunto en la unión universal de PVC. En la figura 26 se puede observar el sistema de sujeción en el interior de la unión universal de PVC.

Figura 26. Posicionamiento del epitelio en la cámara.

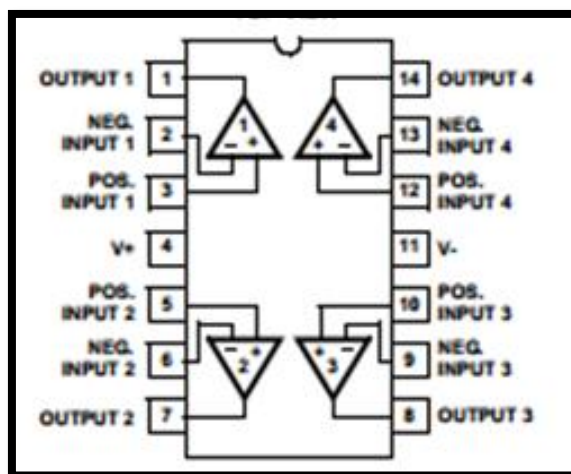


3.5 REGISTRO Y CONTROL DE LA SEÑAL

3.5.1 Amplificación diferencial y compensación de offset. Para el diseño del amplificador diferencial y compensación de offset se tuvo en cuenta la teoría establecida en las referencias 2.6.1. y 2.6.2.

Para la implementación del circuito de amplificación diferencial y compensación de offset se utilizó un circuito integrado LM 324 y siete resistencias.

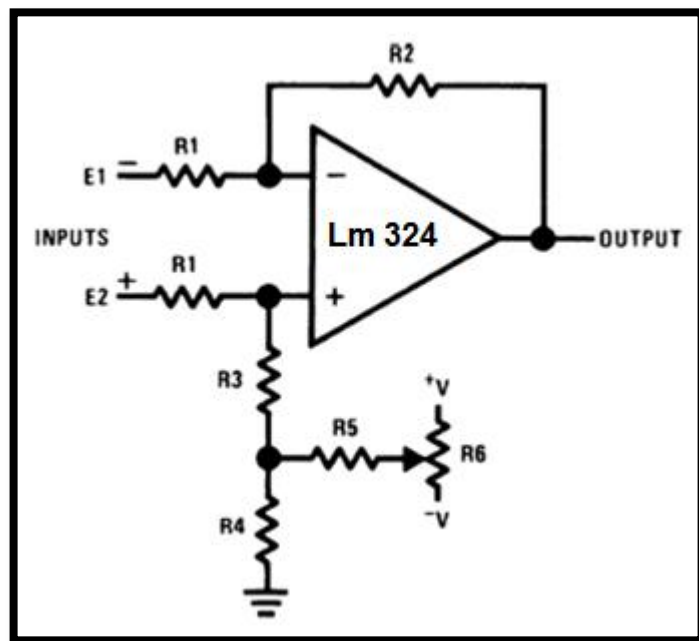
Figura 27. Circuito interno del LM 324.



Fuente [Texas instruments]. En: Operational amplifiers.

El ajuste del offset utilizado en los amplificadores diferenciales puede degradar la relación de rechazo de modo común. El circuito implementado tiene un mínimo efecto sobre el rechazo de modo común. La tensión se divide por R_4 y R_5 con el fin de suministrar una corrección de offset. Los valores de R_4 y R_5 se eligieron de manera que la relación de rechazo de modo común estuviera limitada por el amplificador para los valores de R_3 mayores que $1k\Omega$. Al momento de elegir los valores para R_3 , se debió tener en cuenta la derivación por R_4 y R_5 , por esta razón el valor de R_3 no debe ser menor que $1k\Omega$.

Figura 28. Compensación de offset para un amplificador diferencial.



Fuente [National Semiconductor Corporation]. En: Universal Balancing Techniques.

Las ecuaciones implementadas para garantizar un buen desempeño del circuito fueron las siguientes:

$$R_2 = R_3 + R_4 \quad . \quad (6)$$

$$Ganancia = \frac{R_2}{R_1} \quad . \quad (7)$$

Se deseaba una ganancia de 10 por lo que el valor de las resistencias fue el siguiente:

$$R_1 = R_3 = 10K\Omega$$

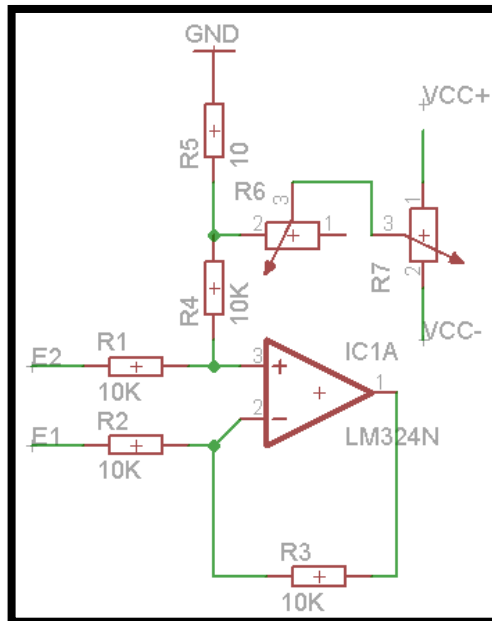
$$R_2 = 100K\Omega$$

$$R_4 = 10\Omega$$

$$R_5 = 4,7K\Omega$$

$$R_6 = \text{es un potenciómetro de } 10k\Omega$$

Figura 29. Esquemático del circuito amplificador y de compensación de offset.



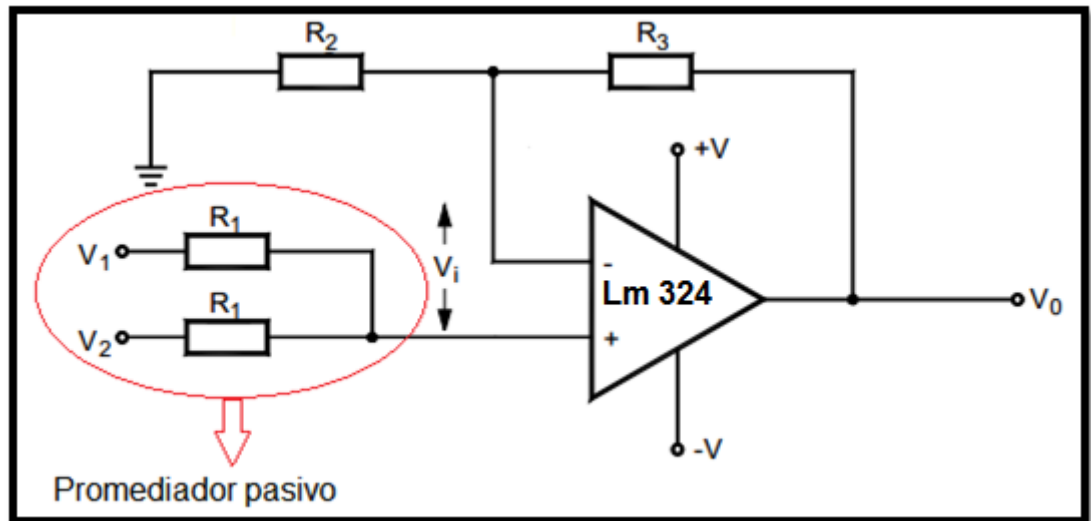
La técnica anteriormente descrita para equilibrar la compensación de tensión en la entrada del amplificador brinda dos ventajas principales: primero, se puede aplicar a todos amplificadores operacionales. En segundo lugar, no interfiere con los circuitos internos del amplificador.

3.5.2 Sumador no inversor. Para la implementación del circuito sumador no inversor se empleó un circuito integrado LM 324 y cuatro resistencias.

Para construir un sumador no inversor de dos entradas se utilizó un promediador pasivo y un amplificador no inversor, tal como se muestra en la figura (33). El circuito del promediador pasivo consta de dos resistencias iguales R_1 y de las dos tensiones que deben sumarse (V_1 y V_2). La salida del promediador pasivo es representado por V_i , en donde V_i es el promedio de V_1 y V_2 , es decir:

$$V_i = \frac{E_1 + E_2}{2} . \quad (8)$$

Figura 30. Sumador no inversor.



Fuente [C.Robert, D. Frederick]. En: Amplificadores operacionales y circuitos integrados lineales. Página 68.

La salida V_o se obtuvo de la amplificación de V_i con una ganancia que fue igual a la cantidad de entradas n . En la figura 33, $n=2$. Para diseñar el amplificador se escogió un valor adecuado para la resistencia R_2 . Se encontró R_3 a partir de la siguiente relación:

$$R_3 = R_2(n - 1) \quad . \quad (9)$$

Por lo tanto: $R_3 = R_2$

Se deseaba una ganancia de 1 y para cumplir con esto se determinó el siguiente valor para las resistencias:

$$R_1 = R_2 = R_3 = 1,48K\Omega$$

Figura 31. Montaje del circuito sumador no inversor.

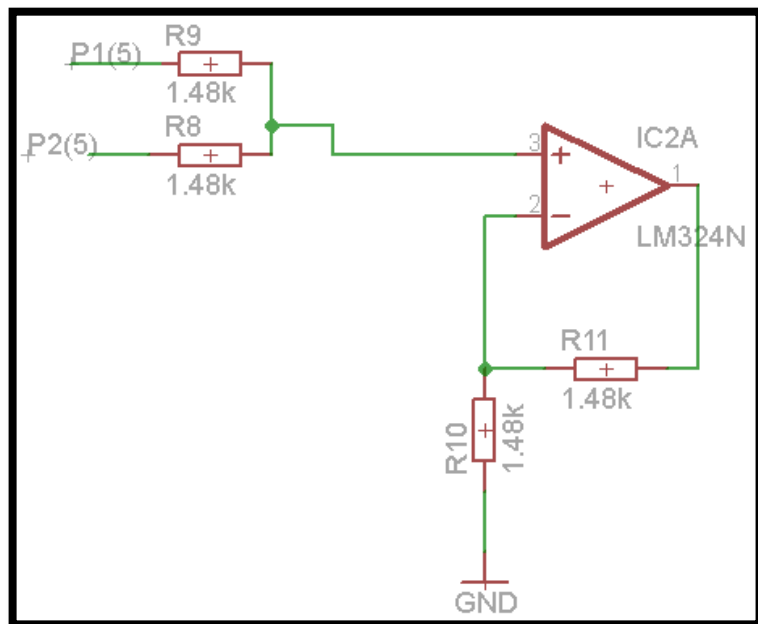


Figura 32. Esquema de instrumentación realizado en el software Eagle.

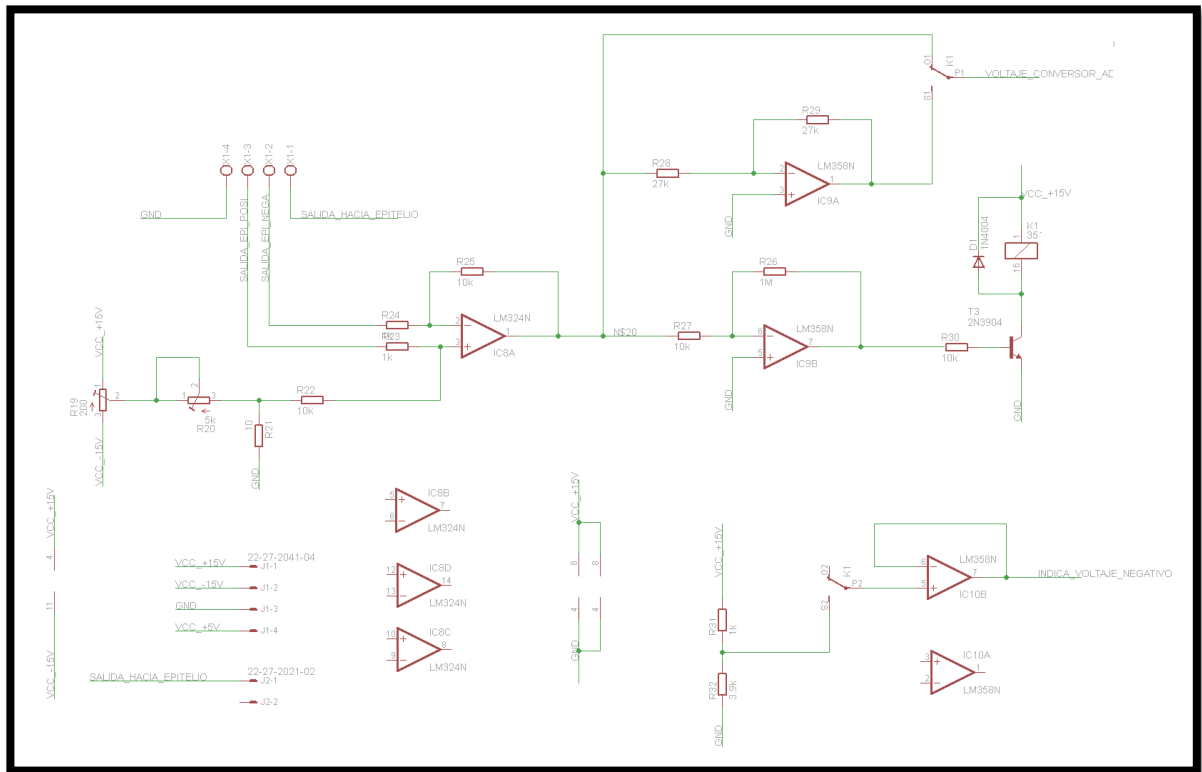


Figura 33. Diseño en Eagle para la plaqueta de instrumentación.

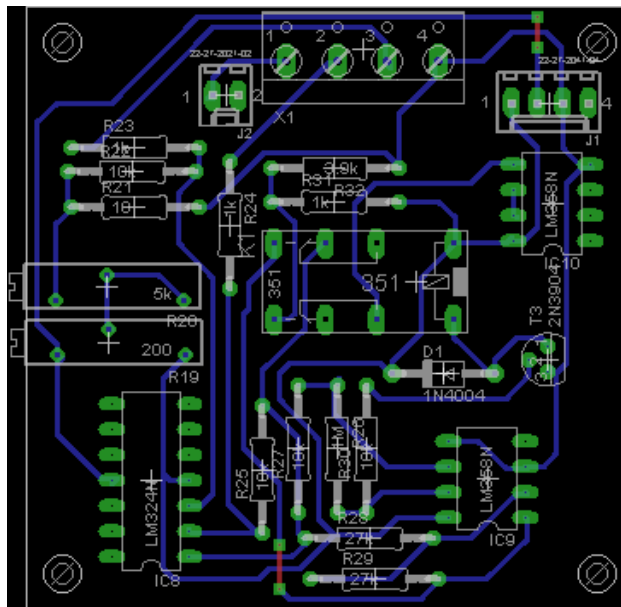
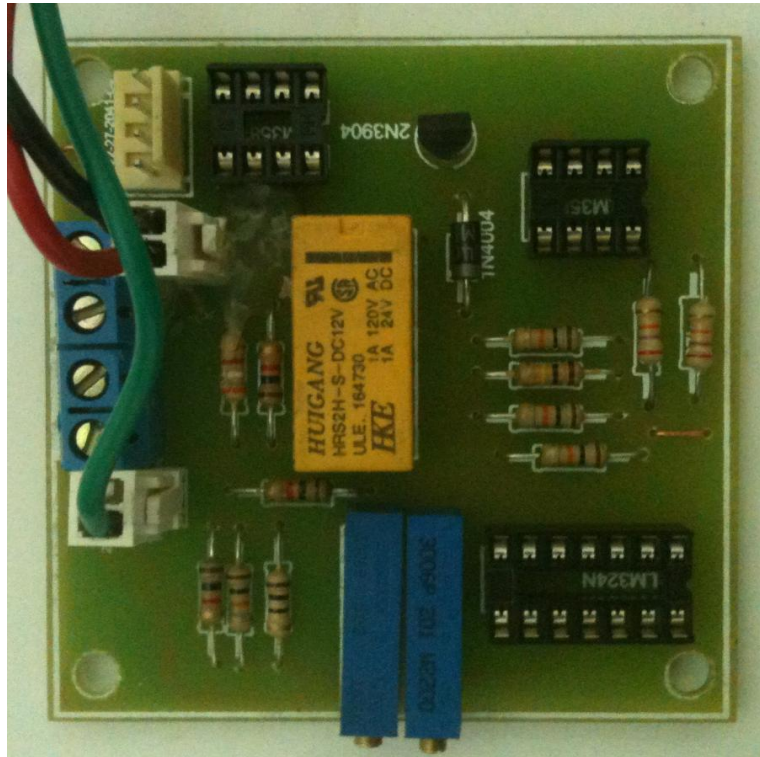


Figura 34. Plaqueta de la etapa de instrumentación.



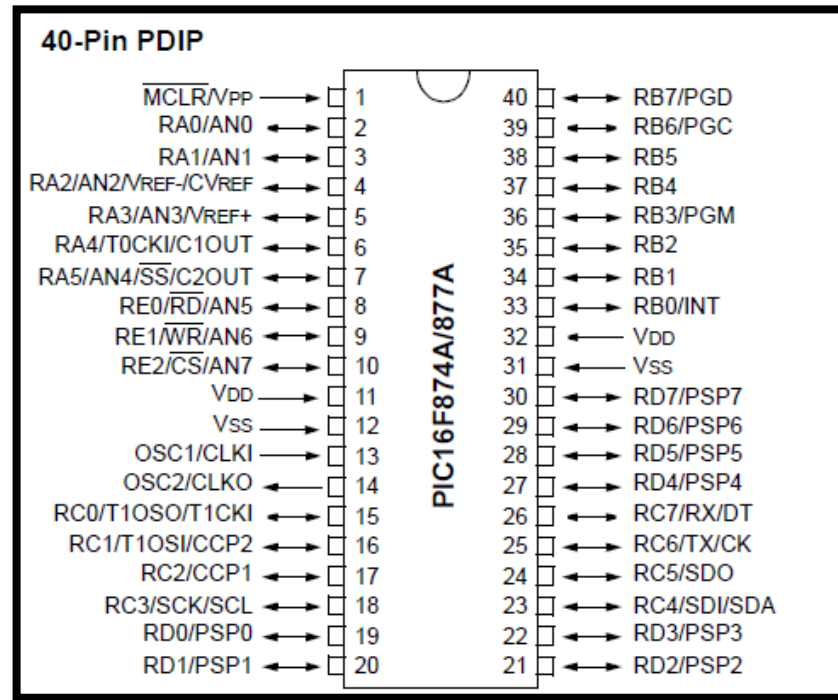
3.6 METODOLOGIA GENERACIÓN, REGISTRO Y ALMACENAMIENTO DE LA SEÑAL

3.6.1 Generación y registro de la señal. Para la estabilización de la diferencia de tensión del epitelio, la estimulación de este y captura de los datos, se utilizó un microcontrolador PIC, debido a las características técnicas que este circuito integrado contiene. (Ver numeral 2.6.3)

Para llevar a cabo este proceso se utilizó un microcontrolador PIC 16f877 el cual tiene las siguientes características dadas por el fabricante:

- Gama media, de 8 bits.
- Cuentan con memoria de programa de tipo EEPROM Flash mejorada.
- Diseño totalmente estático.
- Amplio rango de tensión (2.0 V a 5.5 V).
- Bajo consumo de potencia.

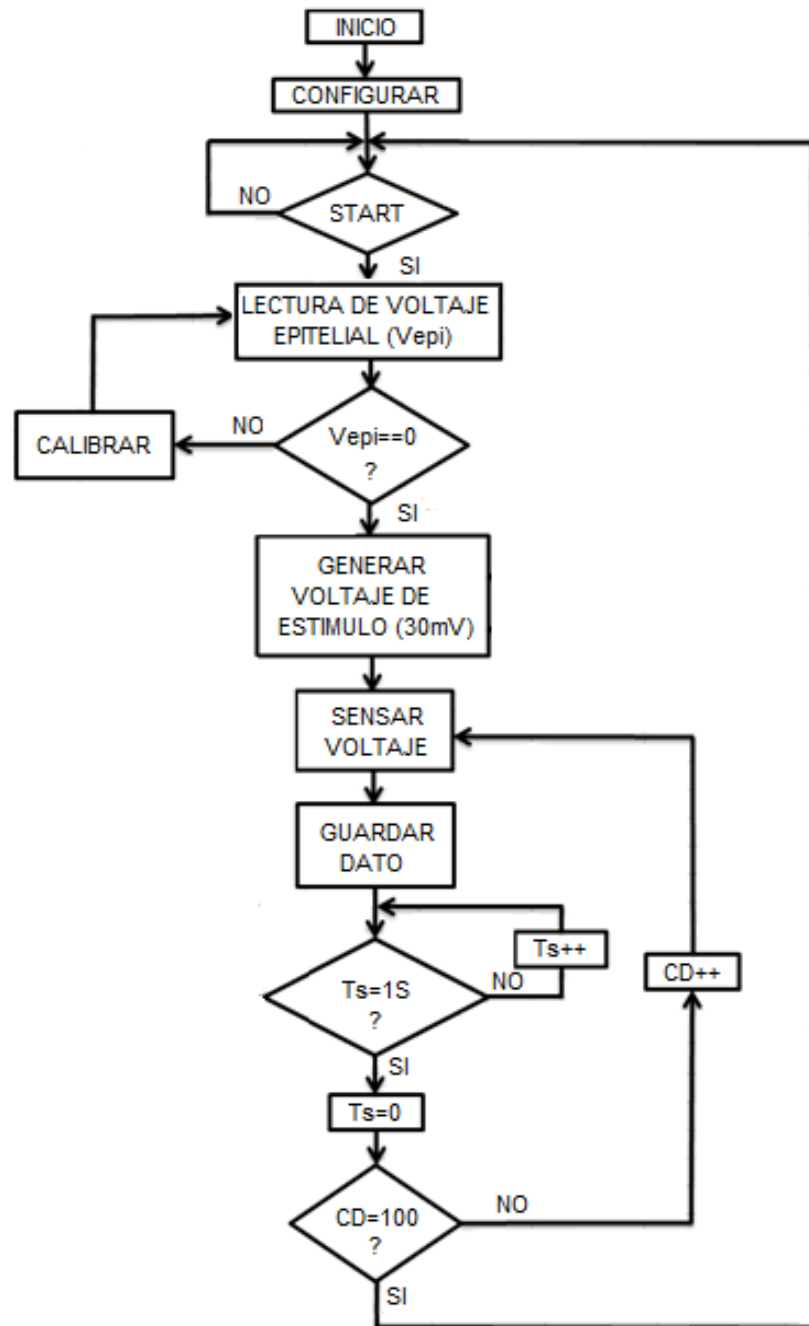
Figura 35. Diagrama de pines.



Fuente: [Microchip Technology Inc.].

El algoritmo implementado en el microcontrolador PIC 16f877 está representado por el siguiente diagrama de flujo:

Figura 36. Diagrama de flujo implementado en el microcontrolador PIC.



Inicialmente se configura el ADC, la memoria, el LCD, las comunicaciones, los puertos y los potenciómetros digitales. Una vez configurados los elementos mencionados anteriormente, se inicia el programa por medio de un pulsador, si este no es activado se queda en este ciclo, de lo contrario, se registra la tensión del epitelio. Seguido a esto, se verifica si la tensión del epitelio es igual a 0 V, de no ser así, se incrementa o decrementa la tensión al epitelio hasta cumplir esta condición.

Una vez estabilizado el epitelio en 0 V, se procede a generar el estímulo (1 estímulo de 30 mV en un tiempo de 100 s; se registran 100 datos por estímulo y cada dato se guarda cada 1s).

Consecuente con lo anterior, se suministra tensión al epitelio (Etapa de estimulación), se sensa la tensión en este y se guardan los datos; se verifica que el tiempo transcurrido para cada dato sea de 1s (T_s), si es así se inicializa el tiempo, de lo contrario se incrementa este. Seguido a esto, se revisa que la cantidad de datos guardados sea igual a 100 (CD), de no ser así, se incrementa dicho número de datos y se realiza el proceso desde la medición de la tensión de esta etapa de estimulación; si los datos guardados son igual a 100, el programa se inicializa, hasta la condición del pulsador.

3.6.2 Almacenamiento de datos. Para almacenar los datos registrados por el microcontrolador PIC provenientes del epitelio, se requiere de una memoria EEPROM.

Para el almacenamiento de los datos se utilizó una memoria EEPROM 24LC256, la cual tiene las siguientes características dadas por el fabricante:

- Amplio rango de tensión (2.5 - 5.5V).
- Frecuencia máxima de reloj de 400kHz.
- 64 byte disponibles para modo de escritura.
- El tiempo del ciclo de escritura es de máximo 5 ms.
- Bajo consumo de energía.

Para la selección de la memoria se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- 1 estímulo tiene una duración de 100s.
- 1 estímulo tiene 100 datos.
- 1 dato equivale a 16 bits y ocupa dos posiciones de memoria.

Cada estímulo ocupa 200 posiciones de memoria, debido a que cada dato ocupa dos posiciones de memoria.

Consecuente a las condiciones mencionadas anteriormente, se determinó que la memoria EEPROM a usar es la 24LC256; ya que esta posee 32000 posiciones de memoria por lo que no presenta inconvenientes en el almacenamiento de los datos, pues con esta memoria se pueden realizar 160 pruebas.

Figura 37. Esquema para generación, registro y almacenamiento de la señal.

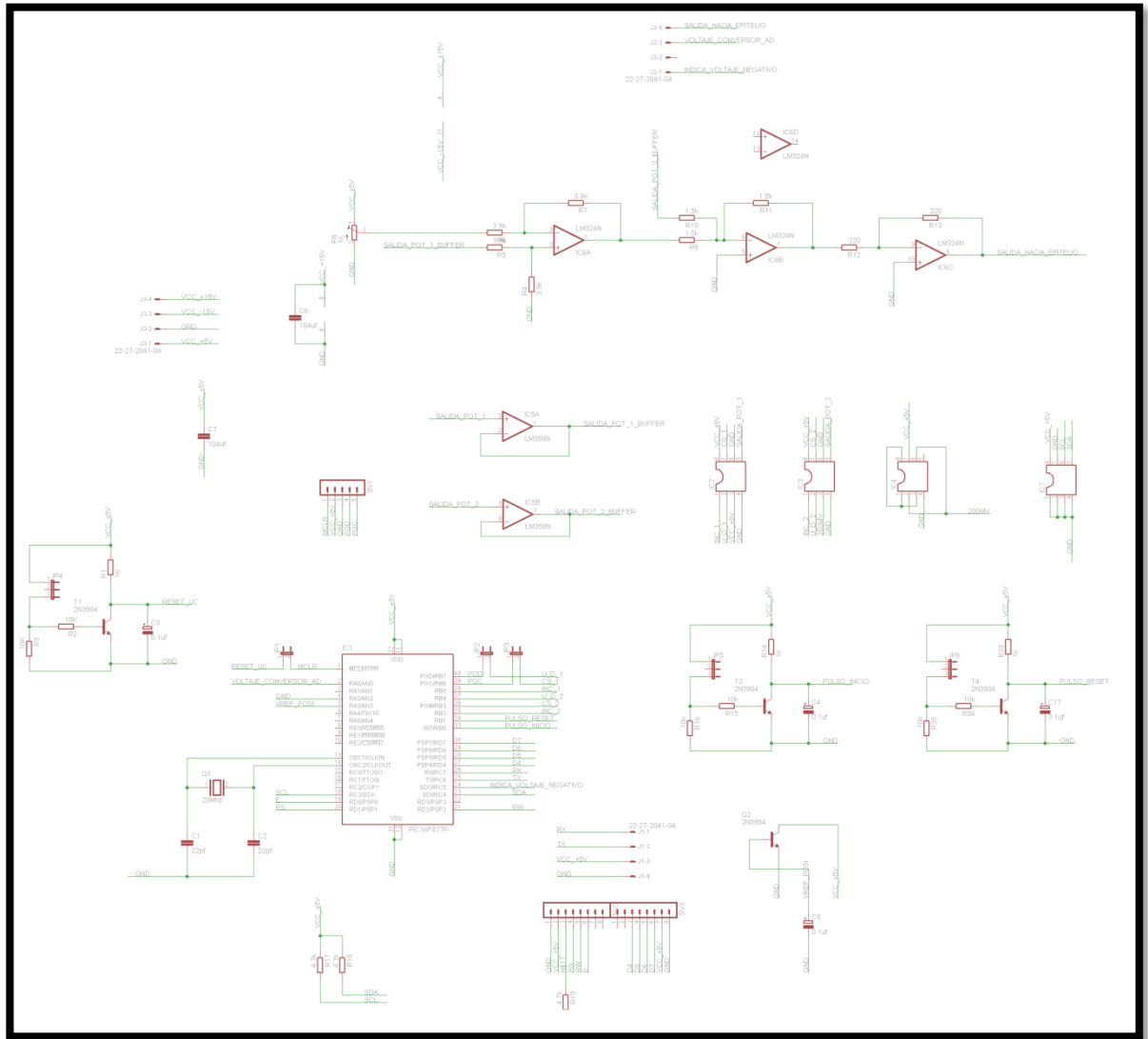


Figura 38. Diseño en Eagle para la plaqueta de generación, registro y almacenamiento.

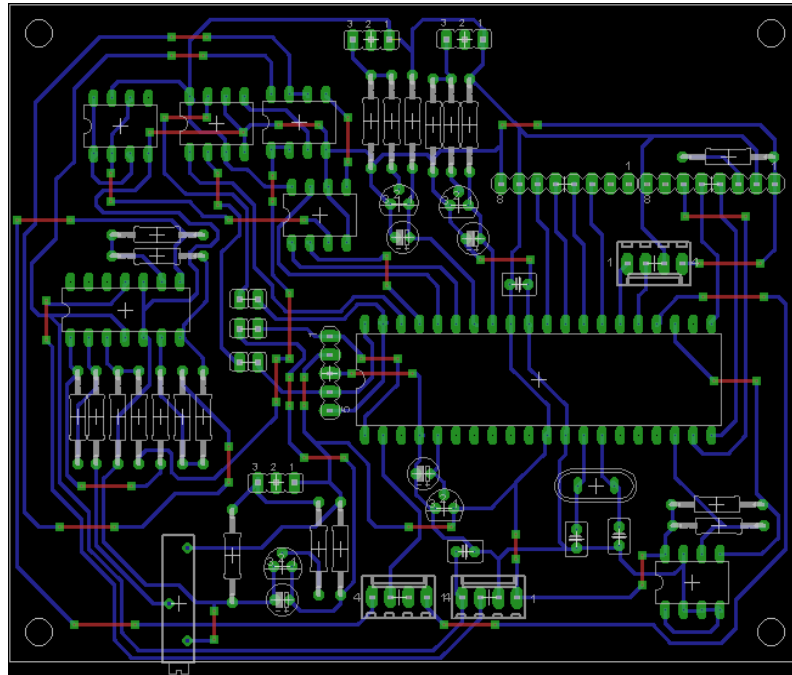
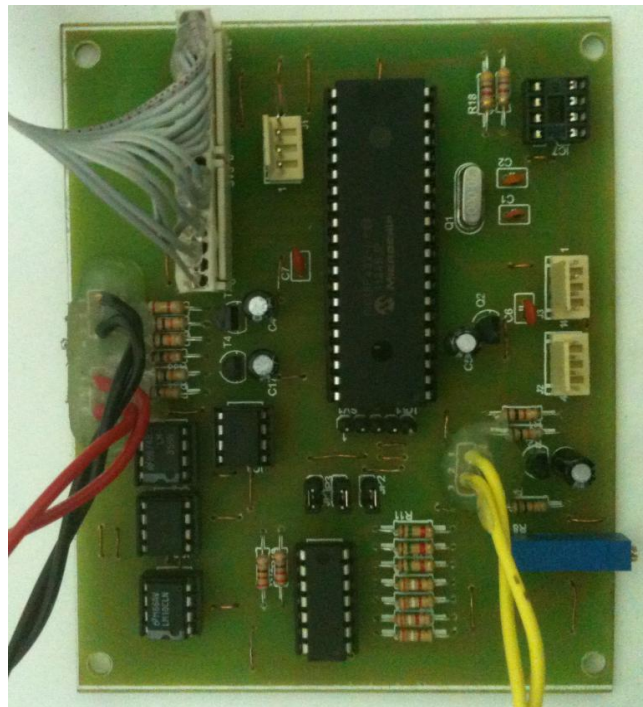


Figura 39. Plaqueta implementada para generación, registro y almacenamiento.



3.7 DISEÑO DE LA FUENTE

La fuente diseñada suministra voltajes de +12 y -12 voltios, así como también entrega 5 voltios para la alimentación del microcontrolador.

Figura 40. Esquema de la fuente.

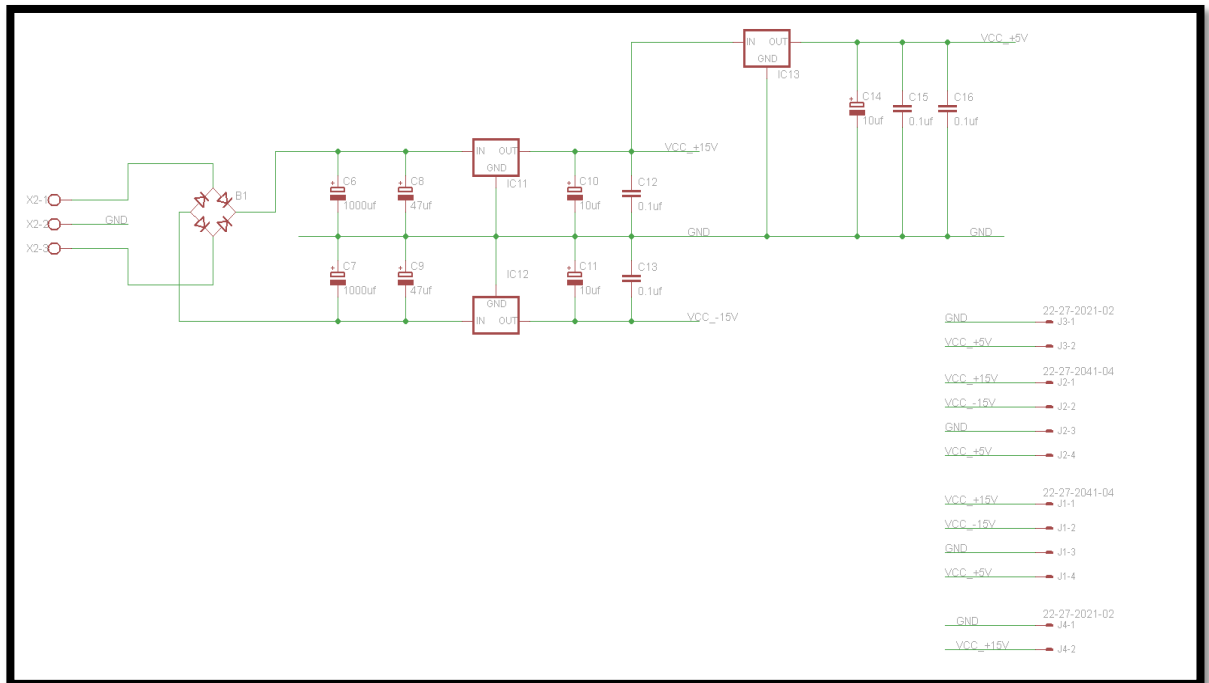


Figura 41. Diseño en Eagle para la plaqueta de la fuente.

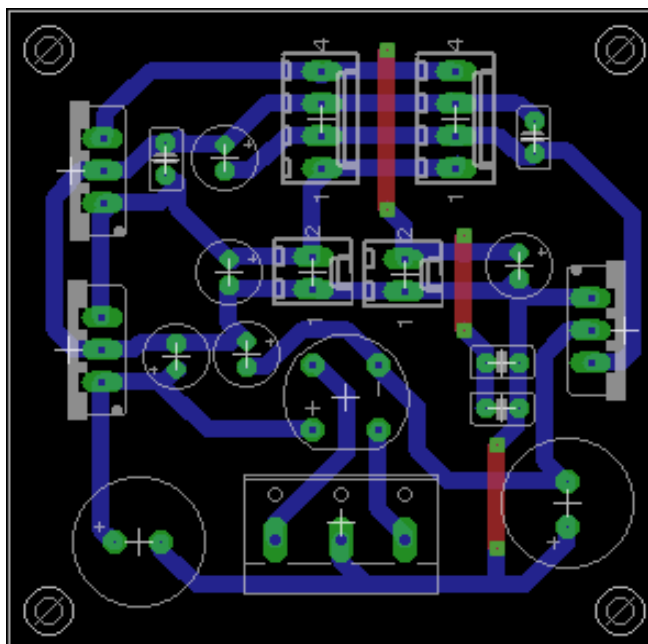


Figura 42. Plaqueta de la fuente.

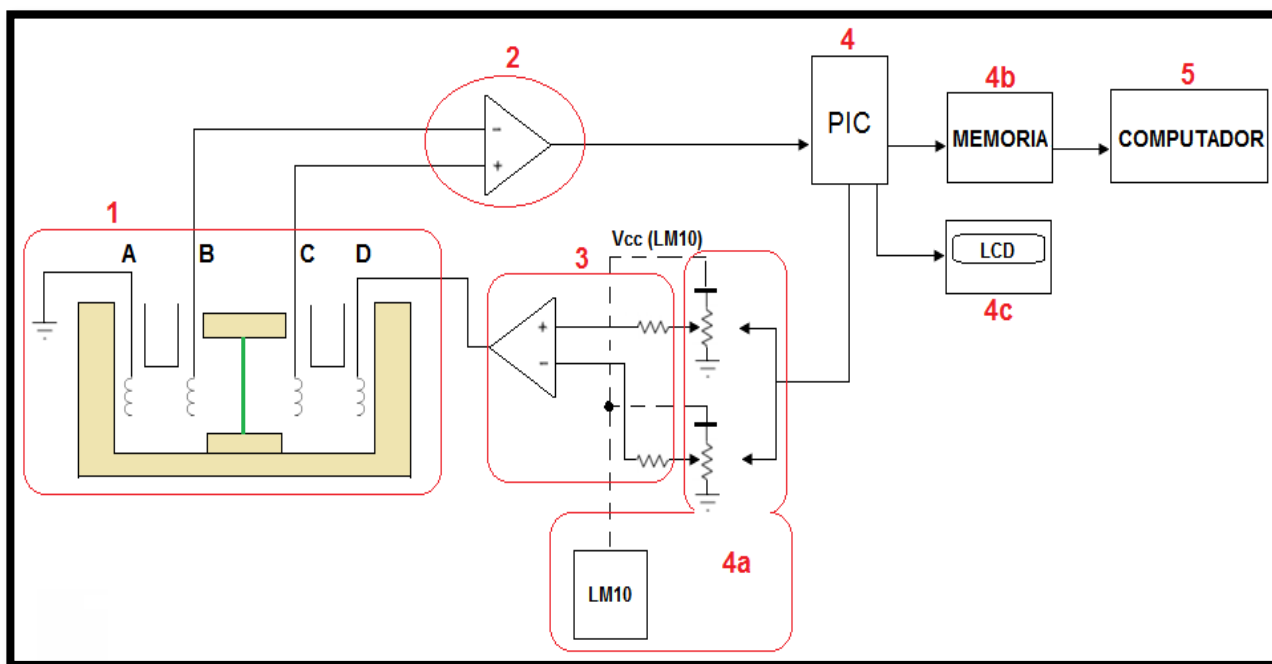


4 IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA

4.1 MODELO COMPLETO DEL SISTEMA DE MEDICIÓN DE POTENCIAL EN EL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ

En los capítulos anteriores se generalizaron los aspectos funcionales de los elementos que componen el sistema de medición de potencial en el epitelio de la rana coquí. Si se establece una conexión conjunta de todos los elementos mencionados, se puede elaborar un modelo completo del sistema nombrado anteriormente; en la figura (43) se pueden observar los elementos enumerados por bloques, a los cuales se hace referencia.

Figura 43. Diagrama de bloques del sistema.



Bloque 1. Este sistema está compuesto por dos compartimientos los cuales son separados por el epitelio aislado de la rana coquí; adicionalmente tiene cuatro orificios en la parte superior en donde se introducen los electrodos de plata cloruro de plata. Los electrodos b y c se encargan de registrar la diferencia de potencial generada por el epitelio y a través de los electrodos a y d se realiza la estimulación.

Bloque 2. Corresponde al circuito de compensación de offset y amplificación. A las entradas diferenciales de este circuito entran los electrodos b y c.

Bloque 3. Pertenece al circuito sumador a través del cual se realiza la estabilización del epitelio (0V) y estimulación de este por medio de dos potenciómetros digitales 9xc104 los cuales son de 100 pasos, donde cada paso proporciona 2mV. El microcontrolador PIC 16f877 se encarga de controlar el incremento o decremento de los potenciómetros mencionados. A la salida de este circuito sumador se conecta el electrodo d.

Bloque 4. Integra los bloques 4a, 4b y 4c. Este bloque se encarga de realizar automáticamente la estabilización, estimulación del epitelio, almacenamiento de los datos y visualización de estos por LCD. La estabilización y estimulación es controlada por la programación del microcontrolador PIC 16f877. Los datos capturados por el microcontrolador PIC 16f877 son almacenados en una memoria EEPROM 24LC256. Adicional a esto la etapa 4a incluye un circuito integrado LM10 el cual se encarga de proporcionar 200mV fijos a los potenciómetros digitales para la estabilización del epitelio. Finalmente, en la etapa 4c se observan los datos que van siendo registrados.

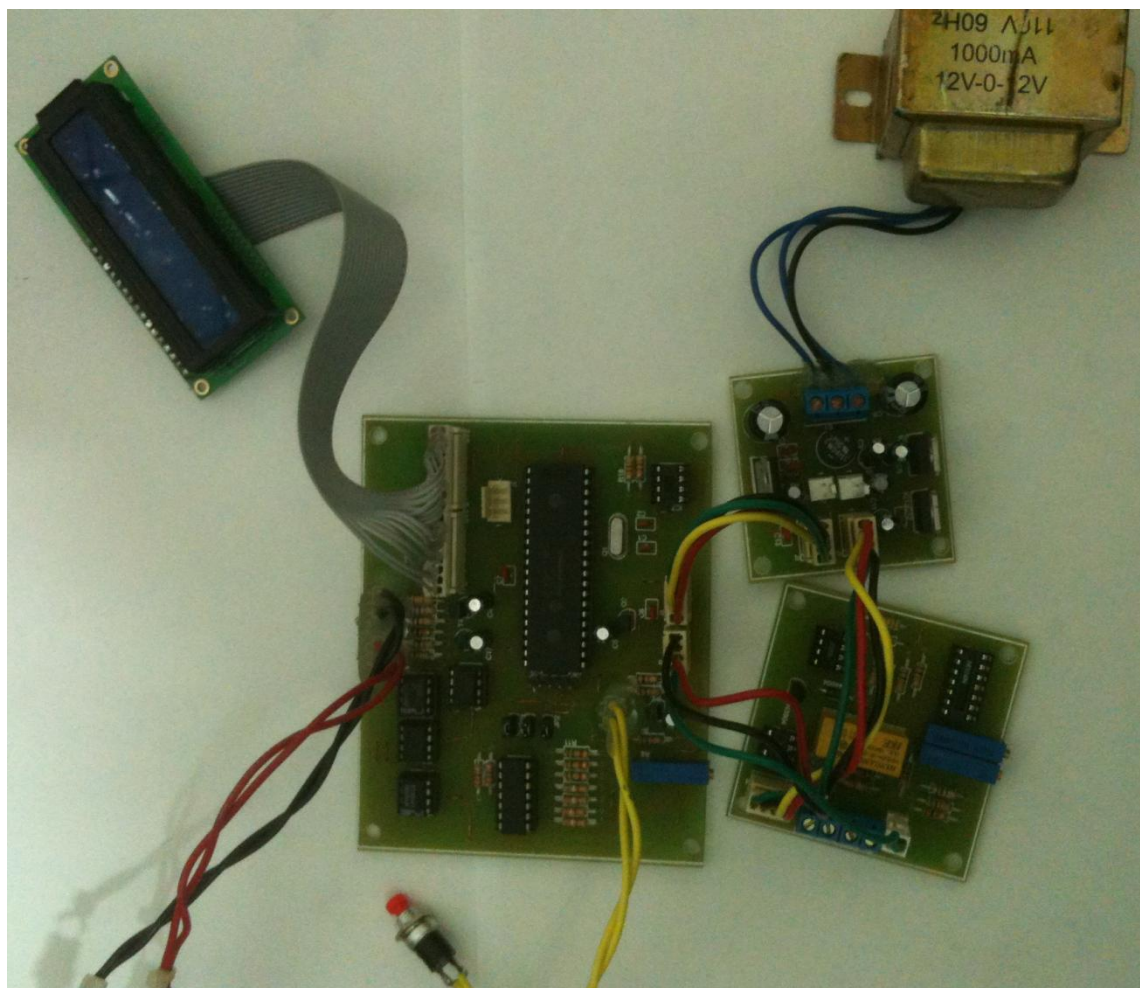
Bloque 5. Se refiere a la visualización de los datos guardados en la memoria. Para lograr dicha visualización se utilizó el software visual C#, en el cual se diseñó la interfaz gráfica que permite al usuario observar la cantidad de datos registrados y el tiempo correspondiente a cada uno de ellos. Posteriormente los datos obtenidos en la interfaz pueden ser copiados y pegados en Microsoft Office Excel para ser graficados.

Figura 44. Simulación del sistema en el software Proteus.



En la figura (45) se muestra se muestra las plaquetas que conforman el sistema implementado.

Figura 45. Plaquetas del sistema completo



5 PRUEBAS Y RESULTADOS

5.1 ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL EPITELIO DE LA RANA COQUÍ

Este estudio se realizó para determinar las dimensiones de la cámara encargada de contener el epitelio, donde se hizo necesario tener datos de espesor, largo y ancho del epitelio de la rana Coquí; para esto se usó un calibrador digital, dos porta objetos y una hoja milimetrada.

El estudio se realizó con una población de 15 ranas Coquí y se dividió en dos etapas, una para medición del espesor del epitelio y la segunda para medición del largo y ancho de este.

Etapas 1. En esta parte se utilizaron dos porta objetos y el calibrador. Inicialmente se mide con el calibrador el espesor de cada porta objeto; una vez se conocen estos datos, el epitelio es colocado en medio de los dos porta objetos y se mide nuevamente con el calibrador el espesor del conjunto. A continuación en la Tabla 2 se muestran todos los datos obtenidos, con el respectivo cálculo del espesor del epitelio.

Tabla 2. Datos para cálculo del espesor del epitelio.

Espesor Porta objeto 1	Espesor porta objeto 2	Espesor porta objetos más epitelio	Espesor Epitelio
1,03 mm	1,03 mm	2,19	0,13
		2,17	0,11
		2,2	0,14
		2,19	0,13
		2,18	0,12
		2,19	0,13
		2,18	0,12
		2,19	0,13
		2,19	0,13
		2,18	0,12
		2,2	0,14
		2,18	0,12
		2,19	0,13
		2,19	0,13
		2,2	0,14
		TOTAL	1,92
		PROMEDIO DATOS	0,13

Etapa 2. Se utilizó una hoja milimetrada para realizar las mediciones de ancho y largo del epitelio de la rana. Una vez se realizó la medición del espesor, el epitelio es colocado sobre la hoja situándolo en la parte superior izquierda y se observan los números de la hoja milimetrada para determinar el largo y ancho del epitelio. Los valores de cada epitelio fueron consignados en la Tabla 3 con sus respectivos promedios.

Tabla 3. Datos para cálculo del ancho y largo del epitelio.

El área promedio encontrada fue de $(1,32 \pm 0,27) \text{ cm}^2$.

ANCHO EPITELIO (cm)	LARGO EPITELIO (cm)
1,2	1,5
1,1	1,3
1,1	1,4
0,9	1,2
1	1,2
1,1	1,1
1,2	0,9
1,3	1,3
1,1	1,4
1,1	1,5
0,8	1,2
0,9	1,1
1	1,3
1,1	1
1	1,3
TOTAL ANCHO (cm)	TOTAL LARGO (cm)
15,9	18,7
PROMEDIO ANCHO (cm)	PROMEDIO LARGO (cm)
1,06	1,25

5.2 PRUEBAS ELÉCTRICAS PARA DETERMINAR LOS CIRCUITOS

Inicialmente las pruebas se realizaron sin estimular el epitelio de la rana coquí con el fin de medir la diferencia de potencial que se genera entre los lados basolateral y apical de este.

Cuando se ubicó la membrana en la cámara, y se agregó la solución Ringer la cual es rica en sodio y baja en potasio, después de un tiempo se observó que se generaba una diferencia de potencial registrada entre 0 – 100 mV, la cual variaba dependiendo del tiempo de medida. En [20] está consignado que dicha diferencia de potencial es de 58 mV y en [24] se reporta una diferencia de potencial entre 10 y 100 mV.

Al momento de realizar cada una de las pruebas se tuvo en cuenta la ubicación de las partes interna y externa del epitelio, ya que los iones fluyen desde la parte externa hacia la interna. Por esta razón se marcó la cámara indicando el sentido de la ubicación del epitelio (In- Out).

5.3 DESEMPEÑO DEL SISTEMA

Para realizar la experimentación con el epitelio se tomó como referencia la bibliografía de Noyes y Rhem (1970) [23], pues el diseño del sistema implementado por los autores es similar al diseño desarrollado en este proyecto.

En el último objetivo de este trabajo se había propuesto realizar pruebas con el fin de validar el funcionamiento del sistema. El término validar no fue el adecuado dado que para hacer dicha validación era necesario comparar este sistema con otros sistemas en los cuales se mide el transporte transepitelial en piel de ranas. El epitelio de rana empleado por Noyes y Rhem [23], fue el epitelio gastrointestinal.

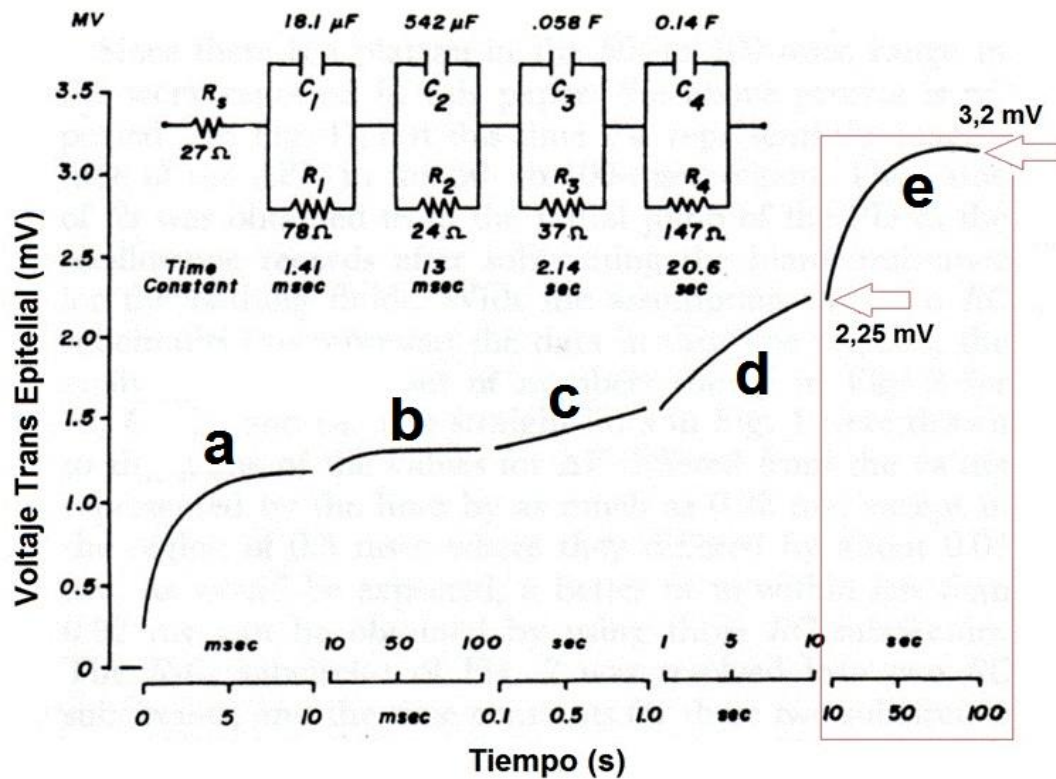
Por otro lado el tiempo que tomó el desarrollo del instrumento y la cámara de Ussing fue adecuado y suficiente para la implementación del prototipo, pero al adaptar la piel de un área tan pequeña y el sistema de cambio de soluciones generó afinaciones y pequeños cambios en el sistema instrumental desarrollado. Se puede decir que el último objetivo corresponde a ensayos preliminares y exploratorios que permitieron monitorear el funcionamiento del sistema de amplificación, estimulación y toma de datos, empleando el epitelio como órgano de

análisis funcional. Se sugiere en próximos trabajos hacer la caracterización de un sistema epitelial de anfibio (piel de rana), empleando tanto la rana objeto de estudio, como otros biomodelos epiteliales de ranas ya estudiadas.

El instrumento a implementar debe facilitar los registros temporales largos, sin embargo es necesario tener un registro lo suficientemente pequeño en la escala temporal para estimar una resolución mínima de los cursos temporales. Para comparar el sistema con al menos un tipo de experimento de registro de curso temporal transepitelial de rana, se decidió replicar uno de los experimentos hechos por Noyes y Rehm [23]. Estos dos autores dispusieron un epitelio de rana y obtuvieron cinco registros (cuyos trazos se pueden observar en la figura 46 (a, b, c, d y e) de los cursos temporales del potencial transepitelial (asociado al transporte de ión sodio en el epitelio). Cada registro se hizo en diferentes rangos de tiempo de muestreo. El primero se muestreó desde 0 a 10 ms, el segundo de 10 a 100 ms, el tercero de 0,1 a 1 s, el cuarto de 1 a 10 s y el último de 10 a 100 s. La razón de este diseño experimental radica en el hecho de que la estructura y subestructuras celulares del epitelio, presentan un circuito equivalente a una resistencia unida en serie con cuatro circuitos RC (como se muestra en la figura 46).

Como el sistema que se está diseñando requiere registros del orden de segundos y hasta minutos, se espera que el curso temporal de las pruebas a realizar se pueda visualizar con una gráfica curva, cóncava hacia abajo, así como la gráfica registrada a la derecha e) en la figura 46, la cual corresponde al tiempo de 10 a 100 segundos con una diferencia de voltaje de 0,95 mV ($3,2 - 2,25$ mV). Para el desarrollo del experimento no se tendrán en cuenta los experimentos equivalentes a los registros b), c) y d) (Ver gráfica 46) de Noyes y Rehm [23], dado que los trazos no logran un estado estacionario en el cual uno pueda determinar que el proceso tiene un límite. Tampoco se tendrá en cuenta la gráfica a) porque el tiempo de registro es muy rápido (ms) lo cual no permite adquirir información suficiente. Se escogió el protocolo de registro que dio como resultado la gráfica e) por estar en un tiempo que permitió observar un estado estacionario y porque este tiempo es muy cercano a los registros del orden de segundos a minutos.

Figura 46. Representación transitoria del potencial en el tiempo.



Fuente: Noyes y Rehm [23].

El experimento propuesto consiste en tomar el epitelio con su solución Ringer renovada (fresca), rápidamente aplicar un potencial eléctrico que deje isopotencial (offset 0 mV) y aplicar un estímulo durante un intervalo de tiempo determinado y registrar el cambio de potencial transepitelial.

Los pasos para hacer este tipo de experimento se numeran a continuación:

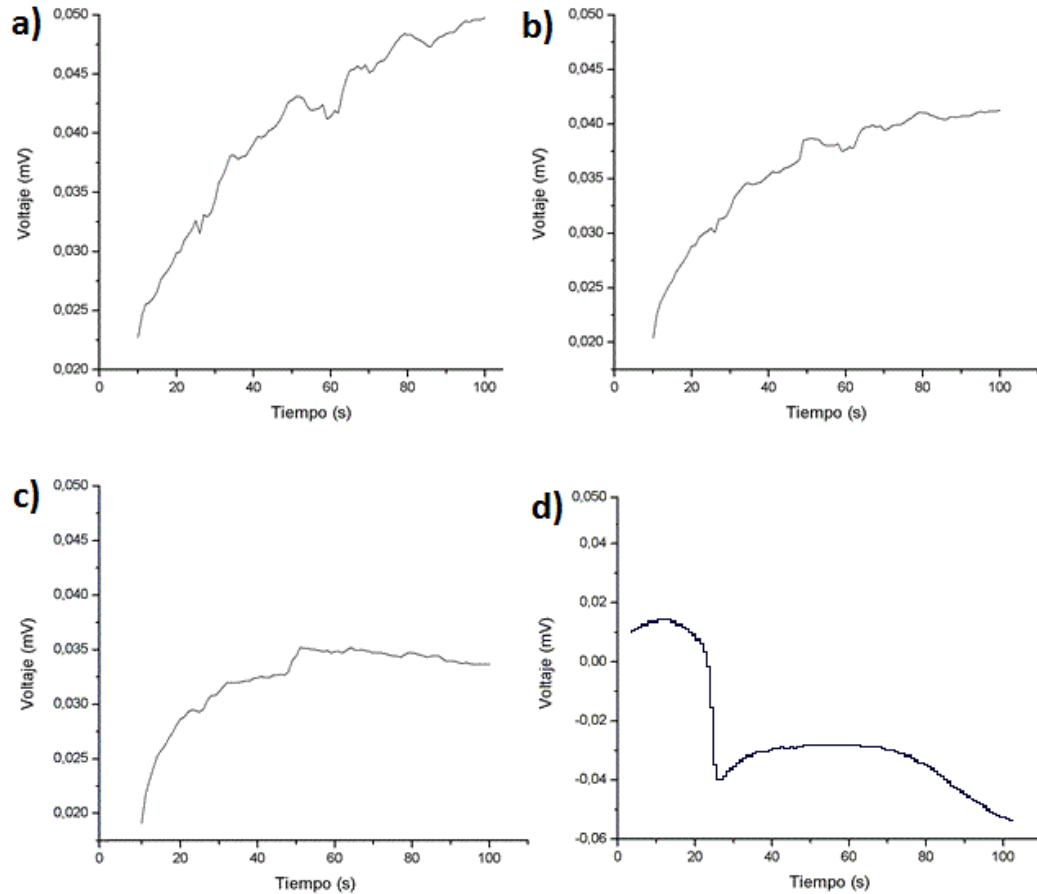
- Se propone montar el epitelio en medio de los empaques de caucho con el fin de que este quede sujeto; se ubican los empaques con el epitelio en la mitad de la cámara para que de esta manera los lados basolateral y apical de este separen los dos compartimientos.

- Se llenan los dos compartimientos con solución Ringer fresca la cual está compuesta de cloruro de sodio 135 mM, cloruro de potasio 5 mM, dicloruro de calcio 2 mM, dicloruro de magnesio 1 mM. Se mantiene la osmolaridad de 270 mili osmolar, con un pH de 6,8.
- Se insertan los cuatro electrodos en cada orificio de la cámara. A través de los electrodos (a) y (d) mencionados en sección 4.1, insertados a los extremos de la cámara se pasa gradualmente tensión con el fin de lograr que la diferencia de potencial registrada en el epitelio en los electrodos (b) y (c) sea cero (corriente de corto circuito).
- Se estimula el epitelio a través de los electrodos (a) y (d) con un incremento de voltaje de 30 mV y se registra el curso temporal medido de 0 a 100 segundos a través de los electrodos (b) y (c).
- El procedimiento se repite con el mismo epitelio 3 veces. Posteriormente se realiza todo el proceso con otro epitelio hasta completar un total de 5 epitelios.

5.4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

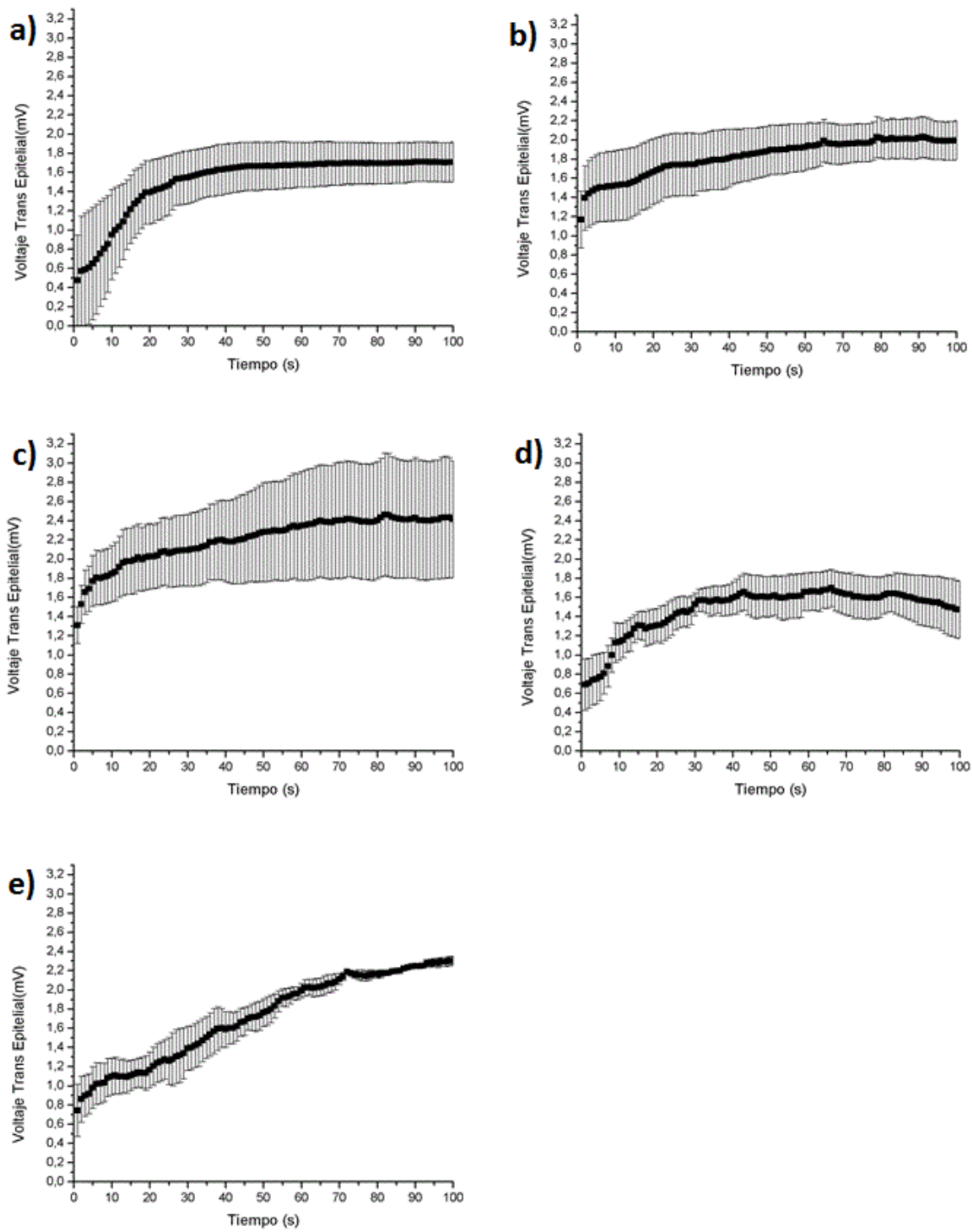
En la figura 47 se observan los cursos temporales de los potenciales de respuesta transitoria después de aplicar estímulos de a) 10mV; b) 20mV; c) 30mV y d) 40mV. En los trazos se puede observar que después de 30mV se presenta una alteración en el trazo con tendencia exponencial en comparación con las gráficas de estimulación de 10 a 30mV; por esta razón se escogió un estímulo de 30mV para realizar las pruebas.

Figura 47. Cursos temporales con estímulos de a) 10, b) 20, c) 30 y d) 40 mV.



En la figura 48 se observan los cursos temporales de cinco experimentos de potencial transmembrana de epitelio de rana coquí en el tiempo con su respectiva suma de errores, la cual corresponde a las zonas superior e inferior sombreadas. Cada experimento muestra el promedio (3 repeticiones) de como varia (durante 100 segundos) el potencial transepitelial al exponer el epitelio de la rana a un estímulo de 30mV. La solución utilizada fue Ringer. Inicialmente se estabilizó el potencial del epitelio (0mV) y a continuación se aplicó un estímulo de 30mV y se registró el potencial transmembrana resultante.

Figura 48. Cursos temporales realizados a cinco epitelios con un estímulo de 30 mV.

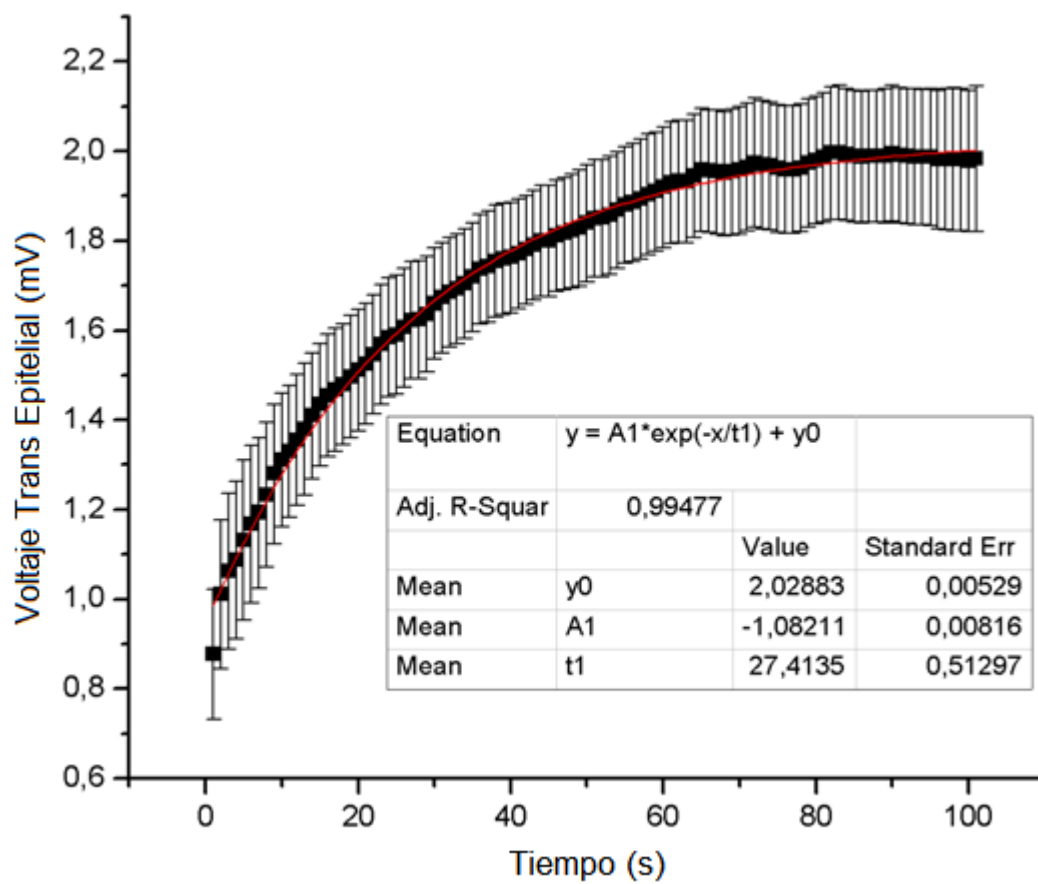


La figura 49 corresponde al promedio de todas las 15 pruebas realizadas; donde se aplicó un estímulo de 30 mV, logrando una curva la cual tiene una constante de tiempo (τ) de 27,41s y una amplitud máxima de 2,02 mV, donde el sistema llega a un estado estacionario similar al comportamiento de carga de un condensador, en un circuito RC.

Adicionalmente la gráfica presenta un comportamiento exponencial, donde al promediar todas las pruebas con la suma de errores, estos también siguen el mismo comportamiento exponencial. Ya que el modelo del epitelio se representa por medio de un circuito RC, se ajusta la gráfica a una ecuación exponencial, donde se obtuvo un τ de 27, 41 s, es decir en este tiempo el condensador del circuito RC se ha cargado un 63,2%.

En el experimento de Noyes y Rehm [23], en el cual utilizaron mucosa gástrica de sapo, se obtuvo un τ de 20, 58 s, el cual es muy similar al τ obtenido en este sistema. Adicionalmente se observa que la curva es equivalente a la gráfica para el mismo intervalo de tiempo reportada en este estudio.

Figura 49. Promedio de los cursos temporales realizados a cinco epitelios.



5.5 ESPECIFICACIONES ELÉCTRICAS Y FÍSICAS DEL SISTEMA

Tabla 4. Especificaciones del sistema

Voltaje operación	110VAC a 60Hz.
Consumo	< 500mA.
Visualización	Pantalla LCD 16x2 caracteres.
Pulsadores	Reset / inicio sistema.
Protección	Fusible 500mA.
Sistema almacenamiento	Guardar 100 registros por prueba.
Cantidad de pruebas que almacena	163 pruebas continuas.
Comunicación a PC	RS232 Conector DB9 Hembra.
Protocolo de comunicación	RS232 a 9600 baudios, 1 bit stop, sin paridad.
Software para adquisición de datos	Visual C#.
Temperatura	23° C
Largo de los alambres los electrodos	25 cm cada uno.
Medidas de la cámara	22,5 cm largo x 4,5 cm alto x 5 cm ancho.

6 LIMITACIONES DEL SISTEMA

El sistema diseñado e implementado para la medición de flujo transepitelial en el epitelio de la rana coquí, tiene una limitante en cuanto al programa implementado en el μc , debido a que el sistema solo realiza un estímulo de 30mV y toma el registro en un rango de tiempo de 0 a 100s; es decir en caso de que el usuario requiera realizar un estímulo mayor o menor, se debe reprogramar el microcontrolador, igual pasa en caso tal que el usuario requiera registros en otro intervalo de tiempo. Esto hace que el sistema pierda versatilidad para la realización de pruebas.

7 CONCLUSIONES

- A partir del estudio morfométrico del epitelio de la rana coquí, se determinaron las dimensiones para el diseño e implementación de la cámara. Las variables que se tuvieron en cuenta para este desarrollo fueron, largo ancho y espesor de los epitelios. En promedio los epitelios extraídos alcanzan un área de $(1,32 \pm 0,27) \text{ cm}^2$. Con este dato se pudo constatar que los epitelios extraídos pueden adaptarse a la unión universal de PVC de media pulgada que se encuentra en el mercado.
- Al hacer las mediciones preliminares dejando el epitelio de rana expuesto a solución Ringer anfibio isomolar, las mediciones de los cursos temporales de potencial transepitelial mostraron que espontáneamente los valores encontrados en la membrana generaban un potencial en un rango de 10 a 100 mV, por lo que se hizo necesario la implementación de un circuito amplificador y un circuito de compensación de la tensión offset, para corregir las fuentes de error. Las mediciones obtenidas son confiables debido a que se tuvieron en cuenta las fuentes de error las cuales se corrigieron o compensaron.
- El epitelio de la rana coquí se consideró como un circuito RC, debido a que el epitelio posee una resistencia y unos canales iónicos los cuales están representados por condensadores, adicionalmente los iones se comportan como cargas. La conductancia iónica es proporcional a la permeabilidad iónica y la capacitancia de la membrana es proporcional al área expuesta de la membrana. Debido a que el epitelio se comporta como un circuito RC, a las graficas obtenidas se les realizó un ajuste exponencial.
- Se implementó un algoritmo de programación confiable el cual permitió realizar mediciones confiables de los parámetros requeridos.
- Al realizar 15 pruebas con epitelios aislados de ranas coquí, se pudo observar que los cursos temporales del potencial transepitelial son muy similares en su forma, presentando forma exponencial con concavidad hacia la parte inferior de la gráfica y estas son similares a los trazos obtenidos por Noyes y Rehm [23], en epitelio de mucosa intestinal de rana.

- Las pruebas se realizaron aplicando estímulos de 10, 20, 30 mV (después de dejar la membrana en 0V) donde el registro de los cursos temporales del potencial transepitelial fueron similares a los trazos obtenidos por Noyes y Rehm [23], exceptuando las membranas a las cuales se les aplicó un estímulo de 40 mV en los que se modificaba dramáticamente la curva con tendencia exponencial. Por esta razón se escogió como estímulo el potencial de 30 mV para hacer pruebas de caracterización estadística posterior.
- El sistema de medición de potencial transmembrana se implementó con elementos de bajo costo y fácil adquisición y se lograron realizar buenas mediciones obteniendo resultados válidos.

8 RECOMENDACIONES

Materiales y sustancias

- Cámara
- Electrodo Ag/AgCl
- Ringer fisiológico
- Epitelio
- Instrumento de medición

Parte I. Extracción del epitelio

- Descerebrar la rana.
- Hacer incisión de la rana en la parte superior de la cabeza.
- Cortar y extraer completamente el epitelio.
- Colocar el epitelio en un recipiente con un poco de Ringer para que el tejido no se deshidrate mientras se continúa con la parte II.

Parte II: Preparación de la cámara

- Identificar cada uno de los agujeros (a,b,c,d) para introducir adecuadamente los electrodos correspondientes.
- Identificar cada uno de los electros (a,b,c,d) los cuales serán introducidos en la cámara.
- Destapar la cámara e introducir el epitelio en medio de las dos mitades de la cámara.
- Agregar Ringer a cada una de las dos mitades de la cámara 15 ml en un lado
- Introducir cada uno de los electrodos en el agujero correspondiente de la cámara.

Parte III: Toma de datos y registro

- Conectar los electrodos en el instrumento de medición.
- Conectar el cable serial del instrumento de medición al puerto serial del computador para visualización de los datos en el software.
- Oprimir el botón inicio del instrumento de medición para empezar con el registro de los datos.
- Abrir el software donde se extrajeron los datos y exportarlos a Excel para ser graficados.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ANGULO Martínez; ANGULO Usategui; CUENCA Martín. Microcontroladores PIC la solución en un Chip. 3 ed. Madrid, España: Paraninfo, 2000. ISBN: 84-283-2371-2.
- [2] ASTARLOA, Armando; ZULUAGA, Aitzol. Sistemas de procesamiento digital, 1 ed. Madrid, España: Delta publicaciones, 20008. ISBN: 978-8492453-03-0.
- [3] BALBACHB, Stefan; EICHINGERB, Thomas; KOENIGA, Petra; LEHR, Claus-Michael; LOOSB, Petra; MUENDOERFERA, Marco; SCHAEFERA, Ulrich; WALKB, Jutta. Online monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER) in an apparatus for combined dissolution and permeation testing. En: International Journal of Pharmaceutics. Saarbruecken, Alemania, 2009.
- [4] BERK Arnold, LODISH Harvey. Molecular Cell Biology, 5 ed. Nueva York, Estados Unidos: Panamericana, 2005. ISBN: 950-06-1374-3.
- [5] BOGDAN, Roman; CLAUSS, Wolfgang; FRONIUS, Martin; VEITH, Christine. Impact of mechanical stress on ion transport in native lung epithelium (*Xenopus laevis*): short-term activation of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ channels. En: Pflugers Arch - Eur J Physiol. Giessen, Alemania. 2008.
- [6] BRETSCHNEIDER F.; WEILLE J. Introduction to Electrophysiological Methods and Instrumentation. 1 ed. Reino Unido: Elsevier, 2006. ISBN-13: 978-0-12-370588-4.
- [7] CASTILLO Graciela A.; ORCE Gabriel G. Response of Frog and Toad Skin to Norepinephrine. En: Department of physiology. Tucumán, Argentina, 1997.
- [8] COUGHLIN R., DRISCOLL F. Amplificadores operacionales y circuitos integrados lineales. 5 ed. Mexico: Pearson, 1999. ISBN: 970-17-0267-0.
- [9] CROUCH, Stanley; HOLLER, James; SKOOG, Douglas. Principios de análisis instrumental. 6 ed. Santa fe, Mexico: Cengage learning, 2008. ISBN: 13-978-970-686-829-9.

[10] Del Razo, Luz M.; Neri, Leticia; Soto, Claudia. Alloxan decreases intracellular potassium content of the isolated frog skin epithelium. En: Comparative Biochemistry and Physiology. México, México, 2001.

[11] GARCÍA, Eduardo. Compilador C CCS y simulador PROTEUS para microcontroladores PIC, 1 ed. Colonia del valle, México: Alfaomega, 2008. ISBN: 978-970-15-1397-2.

[12] GARTNER, Leslie; HIATT, James L. Epitelio y Glándulas; Atlas color de Histología. 3 ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 2003. ISBN: 9500608103.

[13] GORODESKI, George; WHITTEMBURY, Jose. A Novel Fluorescence Chamber for the determination of Volume Changes in Human CaSki Cell Cultures Attached on Filters. En: Cell Biochemistry and Biophysics. Cleveland, Estados Unidos. 1998.

[14] GUALDA, Juan Andrés MARTÍNEZ, Salvador. Electrónica de potencia, componentes, topologías y equipos. 1 ed. Madrid, España: Thomson, 2006. ISBN: 84-9732-397-1.

[15] GUYTON, Arthur; HALL, John E. Tratado de fisiología médica. 11 ed. Barcelona, España: Elsevier, 2008. ISBN: 978-84-8174-926-7.

[16] HERNÁNDEZ, Mauricio; RUIZ, Luis Fernando; WILCHES, Mauricio. Bioingeniería VI. 1 ed. Medellín, Colombia: Universidad Antioquia, 2007. ISBN: 978-958-714-014-9.

[17] HUG, Martin; LI, Hongyu; SHEPPARDA, David N. Transepithelial electrical measurement with the Ussing chamber. En: Journal of cystic fibrosis. Munster, Alemania, 2004, pág 3.

[18] KARP, Gerald. Biología celular y molecular, conceptos y experimentos. 5 ed. México: McGraw-Hill, 2009. ISBN: 978-970-10-625-7.

[19] KAWAGO, Kazuki; MATSUDA, Kouhei; NISHIO, Tomoko; SANO, Yuji; UCHIYAMA, Minoru; YAMADA, Toshiki. Effects of arginine vasotocin and vasopressin receptor antagonists on Na⁺ and Cl⁻ transport in the isolated skin of two frog species, *Hyla japonica* and *Rana nigromaculata*. En: General and Comparative Endocrinology. Toyama, Japan, 2008.

[20] LLINAS R.; PRECHT W. Frog Neurology hand book. New York: Springer, 1976. ISBN: 3-540-07606-9.

[21] Laboratory handbook. Ussing Chamber Analysis of Murine Native Tissues and Polarized Epithelial Cells. Lisboa ,Portugal, 2007.

[22] MOFFETT, David; MOFFETT, Stacia; ONKEN, Horst. The isolated anterior stomach of larval mosquitoes (*Aedes aegypti*): Voltage-clamp measurements with a tubular epithelium. En: Comparative Biochemistry and Physiology. Washington, Estados Unidos. 2005.

[23] NOYES, David; REHM, Warren. Voltage response of frog gastric mucosa to direct current. En: American Journal of Physiology. Alabama, Estados Unidos, 1970.

[24] OAKLEY, Bruce; SCHAFER. Experimental neurobiology: A laboratory Manual. Michigan, Estados Unidos: university of Michigan, 1978. ISBN: 978-047086900.

[25] PHILLIPS, Jonathan E.; WONG, Lid; YEATES, Donovan. Bidirectional Transepithelial Water Transport: Measurement and Governing Mechanisms. En: Biophysical Journal. Chicago, Estados Unidos, 1999.

[26] WEINECK, J. La anatomía deportiva. 4 ed, Barcelona, España: Paidotribo, 2004, ISBN: 84-8019-209-7.

ANEXOS

Anexo A. Características de los circuitos integrados implementados.

POTENCIOMETROS DIGITALES

El potenciómetro digital es un integrado, el cual cumple o simula el funcionamiento de un potenciómetro analógico. Este se compone de un divisor resistivo de $n+1$ resistencias, el cual está conectado respectivamente con sus n puntos intermedios a un multiplexor el cual se encarga de la selección de la salida.

Suelen tener una tolerancia en torno al 20%. Los valores de estos potenciómetros más comunes son de 10K y 100K aunque varían en función del fabricante con 32, 64, 128, 512 y 1024 posiciones en escala logarítmica o lineal. Los principales fabricantes son Maxim, Intersil y Analog Devices.

APPLICATION NOTE
AVAILABLE
AN00 • AN115 • AN120 • AN124 • AN133 • AN134 • AN135



Terminal Voltages $\pm 5V$, 100 Taps

X9C102/103/104/503

Digitally Controlled Potentiometer (XDCP™)

FEATURES

- Solid-state potentiometer
- 3-wire serial interface
- 100 wiper tap points
 - Wiper position stored in nonvolatile memory and recalled on power-up
- 99 resistive elements
 - Temperature compensated
 - End to end resistance, $\pm 20\%$
 - Terminal voltages, $\pm 5V$
- Low power CMOS
 - $V_{CC} = 5V$
 - Active current, 3mA max.
 - Standby current, 750 μA max.
- High reliability
 - Endurance, 100,000 data changes per bit
 - Register data retention, 100 years
- X9C102 – 1 k Ω
- X9C103 – 10 k Ω
- X9C503 – 50 k Ω
- X9C104 – 100 k Ω
- Packages
 - 8-lead SOIC and DIP

DESCRIPTION

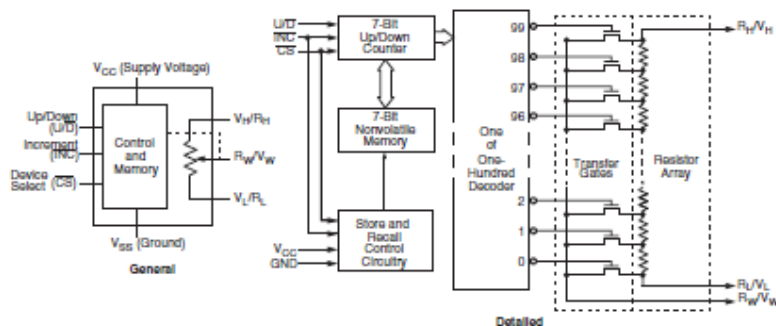
The X9Cxxx are Xicor digitally controlled (XDCP) potentiometers. The device consists of a resistor array, wiper switches, a control section, and nonvolatile memory. The wiper position is controlled by a three-wire interface.

The potentiometer is implemented by a resistor array composed of 99 resistive elements and a wiper switching network. Between each element and at either end are tap points accessible to the wiper terminal. The position of the wiper element is controlled by the CS, U/D, and TNC inputs. The position of the wiper can be stored in nonvolatile memory and then be recalled upon a subsequent power-up operation.

The device can be used as a three-terminal potentiometer or as a two-terminal variable resistor in a wide variety of applications including:

- control
- parameter adjustments
- signal processing

BLOCK DIAGRAM



XDCP is a trademark of Xicor, Inc.

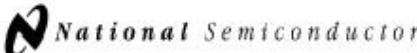
REV 1.1.2 4/27/01

www.xicor.com

Characteristics subject to change without notice. 1 of 10

LM10

Los LM10 son construidos con una referencia de precisión, un buffer de referencia ajustable. Este circuito integrado tiene la capacidad de funcionar con un suministro de tensión alto o bajo (1.1V o 40V). Se obtiene una salida de referencia muy baja, de 200 mV contantes.


November 1994

LM10 Operational Amplifier and Voltage Reference

General Description

The LM10 series are monolithic linear ICs consisting of a precision reference, an adjustable reference buffer and an independent, high quality op amp.

The unit can operate from a total supply voltage as low as 1.1V or as high as 40V, drawing only 270 μ A. A complementary output stage swings within 15 mV of the supply terminals or will deliver ± 20 mA output current with ± 0.4 V saturation. Reference output can be as low as 200 mV. Some other characteristics of the LM10 are

■ input offset voltage	2.0 mV (max)
■ input offset current	0.7 nA (max)
■ input bias current	20 nA (max)
■ reference regulation	0.1% (max)
■ offset voltage drift	2 μ V/ $^{\circ}$ C
■ reference drift	0.002%/ $^{\circ}$ C

The circuit is recommended for portable equipment and is completely specified for operation from a single power cell. In contrast, high output-drive capability, both voltage and current, along with thermal overload protection, suggest it in demanding general-purpose applications.

The device is capable of operating in a floating mode, independent of fixed supplies. It can function as a remote comparator, signal conditioner, SCR controller or transmitter for analog signals, delivering the processed signal on the same line used to supply power. It is also suited for operation in a wide range of voltage- and current-regulator applications, from low voltages to several hundred volts, providing greater precision than existing ICs.

This series is available in the three standard temperature ranges, with the commercial part having relaxed limits. In addition, a low-voltage specification (suffix "L") is available in the limited temperature ranges at a cost savings.

Connection and Functional Diagrams

Metal Can Package (H)

TOP VIEW

TL445662-1

Order Number LM10BH, LM10CH, LM10CLH or LM10H/883
available per SMA # 5962-8760401
See NS Package Number H08A

Dual-In-Line Package (N)

TOP VIEW

TL445662-15

Order Number LM10CN or LM10CLN
See NS Package Number N08E

Small Outline Package (WM)


TOP VIEW

TL445662-17

Order Number LM10CWM
See NS Package Number M14B

TL445662-16

LM324



**OBSELETE PRODUCT
NO RECOMMENDED REPLACEMENT**

CA124, CA224, CA324, LM324, LM2902

Data Sheet *May 2001* *File Number 796.5*

Quad, 1MHz, Operational Amplifiers for Commercial, Industrial, and Military Applications

The CA124, CA224, CA324, LM324, and LM2902 consist of four independent, high-gain operational amplifiers on a single monolithic substrate. An on-chip capacitor in each of the amplifiers provides frequency compensation for unity gain. These devices are designed specially to operate from either single or dual supplies, and the differential voltage range is equal to the power-supply voltage. Low power drain and an input common-mode voltage range from 0V to V+ -1.5V (single-supply operation) make these devices suitable for battery operation.

Part Number Information

PART NUMBER (BRAND)	TEMP. RANGE (°C)	PACKAGE	PKG. NO.
CA0124E	-55 to 125	14 Ld PDIP	E14.3
CA0124M (124)	-55 to 125	14 Ld SOIC	M14.15
CA0124M96 (124)	-55 to 125	14 Ld SOIC Tape and Reel	M14.15
CA0224E	-40 to 85	14 Ld PDIP	E14.3
CA0224M (224)	-40 to 85	14 Ld SOIC	M14.15
CA0324E	0 to 70	14 Ld PDIP	E14.3
CA0324M (324)	0 to 70	14 Ld SOIC	M14.15
CA0324M96 (324)	0 to 70	14 Ld SOIC Tape and Reel	M14.15
LM324N	0 to 70	14 Ld PDIP	E14.3
LM2902N	-40 to 85	14 Ld PDIP	E14.3
LM2902M (2902)	-40 to 85	14 Ld SOIC	M14.15
LM2902M96 (2902)	-40 to 85	14 Ld SOIC Tape and Reel	M14.15

Features

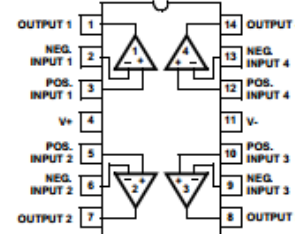
- Operation from Single or Dual Supplies
- Unity-Gain Bandwidth1MHz (Typ)
- DC Voltage Gain100dB (Typ)
- Input Bias Current45nA (Typ)
- Input Offset Voltage2mV (Typ)
- Input Offset Current
 - CA224, CA324, LM324, LM29025nA (Typ)
 - CA1243nA (Typ)
- Replacement for Industry Types 124, 224, 324

Applications

- Summing Amplifiers
- Multivibrators
- Oscillators
- Transducer Amplifiers
- DC Gain Blocks

Pinout

CA124, CA224, CA324, LM2902 (PDIP, SOIC)
LM324 (PDIP)
TOP VIEW



CAUTION: These devices are sensitive to electrostatic discharge; follow proper IC Handling Procedures.

MEMORIA 24LC256

El Microchip Technology Inc. 24LC256 es un serial PROM borrable eléctricamente de 32 K x 8 (256 kbps), el cual funciona en un amplio rango de tensión (1.8 a 5.5V). fue desarrollada para aplicaciones avanzadas de baja potencia como, en comunicaciones personales o adquisición de datos. Tiene la capacidad de escritura de hasta 64 bytes de datos y secuencia de lectura de hasta 256K.

MICROCHIP 24AA256/24LC256/24FC256 **256K I²C™ CMOS Serial EEPROM**

Device Selection Table

Part Number	V _{CC} Range	Max. Clock Frequency	Temp. Ranges
24AA256	1.8-5.5V	400 kHz ⁽¹⁾	I
24LC256	2.5-5.5V	400 kHz	I, E
24FC256	1.8-5.5V	1 MHz ⁽²⁾	I

Note 1: 100 kHz for V_{CC} < 2.5V.
 2: 400 kHz for V_{CC} < 2.5V.

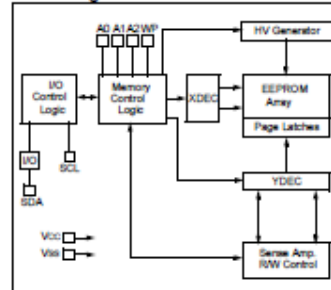
Features

- Low-power CMOS technology:
 - Maximum write current 3 mA at 5.5V
 - Maximum read current 400 μ A at 5.5V
 - Standby current 100 nA typical at 5.5V
- 2-wire serial interface bus, I²C™ compatible
- Cascadable for up to eight devices
- Self-timed erase/write cycle
- 64-byte Page Write mode available
- 5 ms max. write cycle time
- Hardware write-protect for entire array
- Output slope control to eliminate ground bounce
- Schmitt Trigger inputs for noise suppression
- 1,000,000 erase/write cycles
- Electrostatic discharge protection > 4000V
- Data retention > 200 years
- 8-pin PDIP, SOIC, TSSOP, MSOP and DFN packages, 14-lead TSSOP package
- Standard and Pb-free finishes available
- Temperature ranges:
 - Industrial (I): -40°C to +85°C
 - Automotive (E): -40°C to +125°C

Description

The Microchip Technology Inc. 24AA256/24LC256/24FC256 (24XX256*) is a 32K x 8 (256 Kbit) Serial Electrically Erasable PROM, capable of operation across a broad voltage range (1.8V to 5.5V). It has been developed for advanced, low-power applications such as personal communications or data acquisition. This device also has a page write capability of up to 64 bytes of data. This device is capable of both random and sequential reads up to the 256K boundary. Functional address lines allow up to eight devices on the same bus, for up to 2 Mbit address space. This device is available in the standard 8-pin plastic DIP, SOIC, TSSOP, MSOP, DFN and 14-lead TSSOP packages.

Block Diagram



Package Types



Note: * Pin A0 and A1 are no connects for the MSOP package only.

*24XX256 is used in this document as a generic part number for the 24AA256/24LC256/24FC256 devices.

Microcontrolador PIC 16f877



PIC16F87XA

28/40/44-Pin Enhanced Flash Microcontrollers

Devices Included in this Data Sheet:

- PIC16F873A
- PIC16F874A
- PIC16F875A
- PIC16F877A

High-Performance RISC CPU:

- Only 35 single-word instructions to learn
- All single-cycle instructions except for program branches, which are two-cycle
- Operating speed: DC – 20 MHz clock input
DC – 200 ns instruction cycle
- Up to 8K x 14 words of Flash Program Memory, Up to 368 x 8 bytes of Data Memory (RAM), Up to 256 x 8 bytes of EEPROM Data Memory
- Pinout compatible to other 28-pin or 40/44-pin PIC16CXXX and PIC16FXXX microcontrollers

Peripheral Features:

- Timer0: 8-bit timer/counter with 8-bit prescaler
- Timer1: 16-bit timer/counter with prescaler, can be incremented during Sleep via external crystal/clock
- Timer2: 8-bit timer/counter with 8-bit period register, prescaler and postscaler
- Two Capture, Compare, PWM modules
 - Capture is 16-bit, max. resolution is 12.5 ns
 - Compare is 16-bit, max. resolution is 200 ns
 - PWM max. resolution is 10-bit
- Synchronous Serial Port (SSP) with SPI™ (Master mode) and I²C™ (Master/Slave)
- Universal Synchronous Asynchronous Receiver Transmitter (USART/I²C) with 9-bit address detection
- Parallel Slave Port (PSP) – 8 bits wide with external RD, WR and CS controls (40/44-pin only)
- Brown-out detection circuitry for Brown-out Reset (BOR)

Analog Features:

- 10-bit, up to 8-channel Analog-to-Digital Converter (A/D)
- Brown-out Reset (BOR)
- Analog Comparator module with:
 - Two analog comparators
 - Programmable on-chip voltage reference (VREF) module
 - Programmable input multiplexing from device inputs and internal voltage reference
 - Comparator outputs are externally accessible

Special Microcontroller Features:

- 100,000 erase/write cycle Enhanced Flash program memory typical
- 1,000,000 erase/write cycle Data EEPROM memory typical
- Data EEPROM Retention > 40 years
- Self-reprogrammable under software control
- In-Circuit Serial Programming™ (ICSP™) via two pins
- Single-supply 5V In-Circuit Serial Programming
- Watchdog Timer (WDT) with its own on-chip RC oscillator for reliable operation
- Programmable code protection
- Power saving Sleep mode
- Selectable oscillator options
- In-Circuit Debug (ICD) via two pins

CMOS Technology:

- Low-power, high-speed Flash/EEPROM technology
- Fully static design
- Wide operating voltage range (2.0V to 5.5V)
- Commercial and Industrial temperature ranges
- Low-power consumption

Device	Program Memory		Data SRAM (Bytes)	EEPROM (Bytes)	I/O	10-bit A/D (ch)	CCP (PWM)	MSSP		USART	Timers 8/16-bit	Comparators
	Bytes	# Single Word Instructions						SPI	Master I ² C			
PIC16F873A	7.2K	4096	192	128	22	5	2	Yes	Yes	Yes	2/1	2
PIC16F874A	7.2K	4096	192	128	33	8	2	Yes	Yes	Yes	2/1	2
PIC16F875A	14.3K	8192	368	256	22	5	2	Yes	Yes	Yes	2/1	2
PIC16F877A	14.3K	8192	368	256	33	8	2	Yes	Yes	Yes	2/1	2

Anexo B. Software de simulación

PROTEUS

Es un software que recopila programas para simulación y diseño electrónico, el cual fue desarrollado por Labcenter Electronics; este consta de dos programas principalmente, Ares e Isis, y de módulos VSM y Electra.

- **ISIS:** Es un sistema enrutador de esquemas inteligente, el cual permite diseñar planos eléctricos de circuitos con los elementos básicos, como por ejemplo resistencias, condensadores, fuentes de alimentación y generadores de señales; los diseños eléctricos hechos en Isis, se pueden simular en tiempo real con la ayuda del módulo VSM.
- **Módulo VSM:** (Sistema virtual de modelado), es una extensión del programa Isis antes mencionado; este módulo permite simular en tiempo de real, las características de varios microcontroladores, simulando las tareas que se desean llevar a cabo con el programa. Tiene la capacidad de simular circuitos con microcontroladores conectados a teclados de matriz y lcd's.
- **ARES** (Software de edición y ruteo avanzado). Es una herramienta para ubicación, edición de componentes y enrutados, la cual se usa para realizar placas de circuitos impresos.

Anexo C. Software de programación y software para diseño de tarjetas.

VISUAL C#

Es un lenguaje de programación estandarizado por Microsoft, el cual está orientado a objetos y fue diseñado para la infraestructura de lenguaje común. Su sintaxis deriva de C/C++ y del modelo de objetos de la plataforma.NET, el cual es similar al de java. Con sus diversas innovaciones, C# permite desarrollar aplicaciones rápidamente y mantiene las características de elocuencia y distinción de los lenguajes de tipo C. Este software de programación, permite realizar interfaz entre sistemas implementados y el computador, facilitando la adquisición y registro de datos. Visual C# contiene un editor de código completo, plantillas de proyecto, diseñadores, asistentes para código y un depurador eficaz y fácil de usar. La biblioteca de clases .NET Framework ofrece acceso a una amplia gama de servicios de sistema operativo y a otras clases útiles.

EAGLE

(Editor gráfico de diseño de fácil aplicación). Es un software el cual permite realizar diseños y esquemas de circuitos eléctricos y PCBs con auto enrutador para realizar el diseño de circuitos impresos; es fácil de usar y existe una versión gratis la cual permite el fácil acceso a este software. Además EAGLE contiene un editor de diagramas electronicos., donde los componentes pueden ser colocados con un solo click y fácilmente enrutados con otros componentes a base de "cables" o etiquetas. El auto enrutador produce archivos GERBER que son utilizados en la producción e incluye biblioteca de componentes y scrips escritos en un lenguaje de programación similar al C, el cual puede añadir funciones personalizadas.

Anexo D. Quemador y compilador

PICKIT

Son una familia de programadores de microcontroladores PIC realizadas por Microchip Technology. Son utilizados para quemar, programar y depurar los microcontroladores, así como programación de memorias EEPROM.

Existen diferentes versiones de PICkit, como el PICkit2 y el PICkit3. En la versión Microchip PICkit2 tiene una memoria estándar de 128K bytes, adicionalmente integra tres canales analizadores lógicos de 500kHz y un UART, la cual es una herramienta única del PICkit2.

Microchip fabricó una versión mejorada del PICkit2 y lo llamó PICkit3 el cual tiene la misma plataforma, pero a diferencia que cuenta con un procesador, más rápido de 16 bits y un rango más amplio para regulación de tensión, lo cual le permite a este generar tensiones en un rango de 2,5 a 5,5 voltios. Ambos PICkit tienen opción de calibración de la salida con un multímetro, para aumentar la precisión.

COMPILADOR CCS

Un compilador es un programa que se encarga de traducir código de un programa en lenguaje de alto nivel, a otro lenguaje de nivel inferior.

Si se quiere realizar la programación de un microcontrolador PIC, se debe utilizar un compilador; el cual se encarga de generar ficheros en formato Intel hexadecimal. Los compiladores CCS son inteligentes y altamente óptimos, contienen los operadores estándares del lenguaje C y la bibliotecas de funciones son específicas para los registros del microcontrolador PIC, proporcionando a los usuarios una herramienta poderosa para acceder a las funciones de los dispositivos hardware desde el nivel de lenguaje C.